

Die Rolle des Proteins MIA/CD-RAP in der Chondrogenese



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Rainer Schmid

aus

Vilshofen an der Donau

im Jahr

2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
17.07.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:
Prof. Dr. rer. nat. Anja Katrin Bosserhoff

Unterschrift:

Rainer Schmid

Gewidmet meiner Familie

(Therese Schmid, † 28. September 2010)

(Bärli, † 04. April 2010)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2009 bis Juli 2013 unter Anleitung von Frau *Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff* am Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät der Universität Regensburg.

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Frau *Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff* für die Möglichkeit bedanken, diese interessante Doktorarbeit durchzuführen. Mit vielen Ratschlägen, unermüdlichen Einsatz und Unterstützung hat sie mich mit viel Vertrauen engagiert betreut. Sie hatte immer Zeit, um mit mir über molekularbiologische Fragestellungen zu diskutieren und mir neue praktische und theoretische Impulse für meine Arbeit zu geben. Danke dafür!

Mein Dank gilt ebenfalls dem Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg, Herrn *Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter*, für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren.

Herrn *Prof. Dr. Ernst Tamm* und Herrn *Prof. Dr. Klaus von der Mark* danke ich vielmals für die Übernahme der Mentorenschaft dieser Dissertation, für ihre äußerst hilfreichen Anregungen und ihre ständige Bereitschaft meine Arbeit mit Rat und Tat zu unterstützen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an all meine Kollegen in der *Arbeitsgruppe Bosserhoff*, für das nette und freundliche Arbeitsklima, für die unvergessliche Zeit im Labor und für die stets gute Zusammenarbeit.

Danken möchte ich vor allem auch *Dr. Silke Kuphal*. Durch ihre langjährige Erfahrung im Labor und ihr analytisches Denkgeschick half sie mir bei so mancher experimentellen Sackgasse weiter. Sie war immer für alle Fragen und Hilfestellungen offen und erweiterte mit konstruktiven Diskussionen und anregenden Gesprächen meinen Laborhorizont beträchtlich. Ich danke ihr auch besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen langjährigen Laborkolleginnen *Dr. Susanne Schiffner* und *Dr. Barbara Spangler*, die mich herzlich in ihre Laborgemeinschaft aufgenommen haben und mir den Start in die Dissertation durch ihre stets bereitwillige Hilfe, sei es fachlicher oder privater Natur, sehr angenehm machten. Vielen Dank für die entspannte und nette Atmosphäre in dieser Zeit. Bei *Dr. Susanne Schiffner* möchte ich mich auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen bedanken.

Den guten Geist der Arbeitsgruppe *Martina Waeber* möchte ich für die netten Gespräche bei der gemeinsamen Arbeit am Einbettautomaten, den unzähligen professionell ausgeführten Paraffinschnitten und HE-Färbungen von vielen, vielen Mausembryonen danken.

Juliane Gatzhammer und *Reinhold Kusche* danke ich für die exzellente und professionelle Zusammenarbeit im SPF Tierstall, für das Versorgen meiner Mäuse und für das Ansetzen unzähliger Verpaarungen.

Susanne Wallner möchte ich für die schnellen Bestellungen und *Simone Kaufmann* für die Unterstützung im Labor danken. *Sibylla Lodermeier* gebührt ein besonderer Dank für die Hilfe und die Einarbeitung bei der Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus Mäusen.

Bei *Prof. Dr. Gero Brockhoff* bedanke ich mich für die Möglichkeit die FACS Analysen durchzuführen, sowie für die Hilfe bei der Auswertung und die professionelle Diskussion der Ergebnisse. *Elisabeth Schmidt-Brücken* danke ich für die methodische Einarbeitung.

Nicht zu vergessen ist meine „Kaffee-Runde“: *Anne, Barbara, Eva, Susi, Silke, Steffi* und *Stephan*, die mir bei sämtlichen Krisen stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke für die Unternehmungen und die Freundschaft auch außerhalb der Arbeit.

Ganz besonders aber möchte ich mich bei meiner *Familie* und bei meinen *Freunden* bedanken. Meinen *Eltern*, die durch ihre finanzielle und persönliche Unterstützung mein Studium und meine Promotion erst ermöglicht haben. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid, mir den Rücken stärkt, stets an mich glaubt und mir alle Möglichkeiten gegeben habt, mich so zu entwickeln, wie ich heute bin. Meiner Schwester *Anita* und meiner Nichte *Josi* danke ich für die schönen Momente im Familienkreis, die einem immer wieder Kraft gaben. Meinen *Freunden* möchte ich für die vielen ehrlich gemeinten Nachfragen in stressigen Zeiten, die Ablenkung an den Wochenenden und in den Urlauben herzlichst danken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Die Chondrogenese.....	5
1.1.1 Mesenchymale Kondensation	5
1.1.2 Differenzierung zu Chondrozyten.....	7
1.2 Die Enchondrale Ossifikation.....	8
1.2.1 Terminale Differenzierung (Hypertrophie und Mineralisierung)	8
1.2.2 Vaskularisation, Apoptose und Ossifikation	9
1.2.3 Die Wachstumsfuge	10
1.3 Die Regulation der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation.....	12
1.3.1 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle	12
1.3.2 Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle	14
1.3.3 Lokal sekretierte parakrine Signalmoleküle	16
1.3.4 Transkriptionsfaktoren.....	24
1.3.4.1 Die Sox-Familie von Transkriptionsfaktoren	24
1.3.4.2 Runx2	28
1.3.4.3 Tfap2	29
1.4 MIA/CD-RAP	31
1.4.1 Die MIA-Proteinfamilie.....	31
1.4.2 Proteinstruktur	32
1.4.3 MIA im malignen Melanom.....	33
1.4.4 MIA/CD-RAP im Knorpel	34
2. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 In vivo (adult) und in vitro Untersuchungen zur Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel	37
3.1.1 Die Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel unter pathologischen Bedingungen	38
3.1.2 Der Einfluss von MIA/CD-RAP auf Proliferation und Differenzierung in der Chondrogenese	41
3.1.3 Die Regulation des <i>54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein</i> (p54 ^{nrb}) durch MIA/CD-RAP	45
3.1.4 Die Rolle von p54 ^{nrb} in der MIA/CD-RAP vermittelten Chondrogenese.....	46
3.1.5 Die Beteiligung des MAPK/ERK-Signalweges an der MIA/CD-RAP-abhängigen Regulation von p54 ^{nrb}	50
3.2 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von p54^{nrb} durch MIA/CD-RAP	51

3.2.1	<i>In silico</i> Analyse der $p54^{nrb}$ -Promotorregion.....	51
3.2.2	Erste Hinweise auf die Aktivität des $p54^{nrb}$ -Promotors im malignen Melanom	53
3.2.3	Regulation der $p54^{nrb}$ -Promotorregion in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP in Mensch und Maus.....	54
3.2.4	Identifizierung der exakten $p54^{nrb}$ -Promotorregion, welche die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung vermittelt	56
3.2.5	Identifizierung der MIA/CD-RAP-relevanten Transkriptionsfaktorbindestelle im $p54^{nrb}$ -Promotor.....	58
3.2.6	Identifizierung des Transkriptionsfaktors, welcher den $p54^{nrb}$ -Promotor in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP aktiviert	63
3.2.7	YBX1 als Mediator der MIA/CD-RAP-abhängigen Aktivierung des $p54^{nrb}$ -Promotors.....	65
3.3	<i>In vivo</i> (embryonal) und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese	69
3.3.1	Untersuchung der enchondralen Ossifikation in MIA- <i>knockout</i> -Mäusen	69
3.3.2	Untersuchung von Regulatoren der hypertrophen Differenzierung in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP	72
3.3.3	Untersuchung von Regulatoren der Proliferation in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP	73
3.3.4	Die Beteiligung von AP1 und CREB in der MIA/CD-RAP-abhängigen Chondrogenese	74
4.	Diskussion	76
4.1	Neue Erkenntnisse zur Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel.....	76
4.1.1	Erhöhte Knorpelregeneration in MIA- <i>knockout</i> -Mäusen während Osteoarthritis und Frakturheilung.....	76
4.1.2	Erhöhte Proliferation und verzögerte Differenzierung in MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen	79
4.1.3	Das Protein $p54^{nrb}$ vermittelt die Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese	80
4.2	MIA/CD-RAP fördert die Chondrogenese auf transkriptioneller Ebene.....	81
4.2.1	MIA/CD-RAP reguliert eine hoch konservierte Region im $p54^{nrb}$ -Promotor	82
4.2.2	MIA/CD-RAP aktiviert die Transkription des $p54^{nrb}$ -Promotors per YBX1	82
4.2.3	YBX1 in der Chondrogenese.....	83
4.2.4	Spielt YBX1 auch in anderen Bereichen der Chondrogenese eine Rolle?	84
4.2.5	Mögliche Wege der YBX1-Aktivierung durch MIA/CD-RAP.....	85
4.3	Redundante Mechanismen in der Chondrogenese von MIA-<i>knockout</i>-Mäusen.....	86
4.3.1	Die enchondrale Ossifikation in MIA- <i>knockout</i> -Mäusen ist durch eine erhöhte Chondrozytenproliferation und eine verzögerte Differenzierung gekennzeichnet	87
4.3.2	Die verminderte $p54^{nrb}$ -Expression in MIA-defizientem Gewebe wird kompensiert.....	89
4.3.3	L-Sox5 hat keinen Einfluss auf die Redundanz in der Chondrogenese von MIA- <i>knockout</i> -Mäusen	90
4.3.4	Sox9 ist der Hauptmediator der Redundanz in MIA- <i>knockout</i> -Mäusen	91
4.3.5	Die Regulation der AP1- und CREB-Aktivität ermöglicht eine normale Entwicklung von MIA- <i>knockout</i> -Mäusen	92

5. Material und Methoden.....	94
5.1 Material	94
5.1.1 Bezugsquellen von allgemeinen Materialien, Chemikalien und Enzymen.....	94
5.1.2 Geräte, Apparaturen und Software	97
5.1.3 Antikörper, DNA-Farbstoffe, Inhibitoren und rekombinante Proteine.....	99
5.1.4 DNA- und Proteinstandard	101
5.1.5 Plasmide.....	102
5.1.6 Oligonukleotide.....	105
5.1.7 <i>Escherichia coli</i> Bakterienstämme	110
5.1.8 Säugetierzelllinien	110
5.1.9 Mäuse.....	110
5.2 Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen	111
5.2.1 Medien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	111
5.2.2 Medien zur Anzucht von Säugetierzellen	111
5.2.3 Antibiotika und Antimykotika	112
5.2.4 Puffer und Lösungen	112
5.3 Methoden.....	118
5.3.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	118
5.3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> BMH 71-18	118
5.3.1.2 Kultivierung.....	118
5.3.1.3 Transformation	119
5.3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Midi-Präparation)	119
5.3.2 RNA-Methoden.....	120
5.3.2.1 Isolierung von RNA	120
5.3.2.2 Reverse Transkription (RT-PCR)	121
5.3.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	121
5.3.3 DNA-Methoden.....	123
5.3.3.1 Isolierung von genomischer DNA	123
5.3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	123
5.3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	124
5.3.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	125
5.3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	125
5.3.3.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	125
5.3.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide.....	126
5.3.3.8 Mutagenese von Plasmidkonstrukten	126
5.3.3.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	128
5.3.4 Protein-Methoden	129
5.3.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysat).....	129
5.3.4.2 Herstellung von Kernproteinextrakten.....	129
5.3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen	130
5.3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	130
5.3.4.5 Western Blot.....	131
5.3.4.6 Immunhistochemie	131

5.3.5	Zellkulturmethoden	133
5.3.5.1	Kultivierung von humanen und murinen Melanomzelllinien.....	133
5.3.5.2	Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen aus Mäusen	133
5.3.5.3	Differenzierung von murinen mesenchymalen Stammzellen.....	134
5.3.5.4	Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff.....	134
5.3.5.5	Transiente Transfektion mit siRNA	135
5.3.5.6	Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA (Nukleofektion™)	136
5.3.5.7	Luciferase-Reportergen-Assay	136
5.3.5.8	Proliferations-Assay (XTT)	137
5.3.5.9	BrdU/Hoechst Quenching-Technik	138
5.3.6	Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)	139
5.3.6.1	Herstellung radioaktiv markierter EMSA-Sonden	139
5.3.6.2	Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente	139
5.3.6.3	EMSA (Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay).....	140
5.3.6.4	Nachweis radioaktiver Produkte durch Autoradiographie	140
5.3.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	141
5.3.7.1	Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden.....	141
5.3.7.2	Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden und Detektion	142
5.3.8	Arbeiten mit Mäusen	144
5.3.8.1	Haltungsbedingungen	144
5.3.8.2	Zuchtbedingungen	144
5.3.8.3	Generierung der heterozygoten MIA- <i>knockout</i> -Mauslinie	144
5.3.8.4	Genotypisierung auf MIA-Defizienz	144
5.3.8.5	Embryonen	145
5.3.8.6	Herstellung von Paraffinmaterial	146
5.4	Statistische Auswertung.....	147
Eigene Publikationen		148
Literaturverzeichnis		149
Abkürzungsverzeichnis		173

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zum besseren Verständnis der molekularen Vorgänge in der Chondrogenese die Rolle des Proteins MIA/CD-RAP mit Hilfe der MIA-*knockout*-Maus untersucht.

Eine anfängliche Studie zum Auftreten von spontaner Osteoarthritis (OA) gab Hinweise auf eine verminderte Ausbildung von OA in MIA-*knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Diese Beobachtung wurde in Mausmodellen zur Untersuchung von Knorpelschädigung und -entwicklung weiter verfolgt, um zu klären, ob MIA/CD-RAP für Knorpelstabilität und -entwicklung wichtig ist. In einem Modell zur Induktion von Osteoarthritis und in einem Frakturheilungsmodell konnte interessanterweise eine erhöhte Knorpelregeneration in MIA-*knockout*-Mäusen gezeigt werden. Durch den Verlust von MIA/CD-RAP kommt es zu einer erhöhten Proliferation von Chondrozyten, was zur erhöhten Regenerationsfähigkeit des Knorpels beiträgt. *In vitro* konnte ebenfalls eine erhöhte Proliferation von mesenchymalen Stammzellen, isoliert aus MIA-*knockout*-Mäusen, bestätigt werden. Diese weisen zusätzlich eine verzögerte Differenzierung auf.

Die Analyse von Gewebe aus MIA-*knockout*-Mäusen zeigte eine stark verminderte Expression des Proteins NONO (p54^{nrb}), einem kürzlich beschriebenen Aktivator der Sox9-abhängigen Förderung der Chondrogenese. In dieser Dissertation konnte p54^{nrb} als Zielprotein von MIA/CD-RAP identifiziert werden, über welches die MIA/CD-RAP-abhängige Förderung der Chondrogenese vermittelt wird. MIA/CD-RAP fördert dabei die Chondrogenese über eine Proliferationsinhibition von chondrogenen Vorläuferzellen, was durch eine Inhibition der Cyclin D2-Expression erreicht wird. Desweiteren wird die Differenzierung von chondrogenen Vorläuferzellen durch eine p54^{nrb}-gesteuerte Aktivierung der Kollagen Typ II-Expression gefördert.

Weitere Ergebnisse dieser Dissertation zeigten, dass MIA/CD-RAP die p54^{nrb}-Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert. Es konnte eine hoch konservierte Region im p54^{nrb}-Promotor identifiziert werden, welche nötig und ausreichend für die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung ist. Die funktionelle Analyse dieses Promotorstücks identifizierte den Transkriptionsfaktor YBX1 als den Faktor, der die MIA/CD-RAP vermittelte Aktivierung der p54^{nrb}-Transkription steuert. Immunhistochemische Untersuchungen, des bislang in der Chondrogenese noch nicht beschriebenen Transkriptionsfaktors YBX1, zeigten eine deutliche Expression in Chondrozyten der Wachstumsfuge. YBX1 konnte somit erstmalig als Mediator der MIA/CD-RAP Wirkung in der Chondrogenese beschrieben werden.

Obwohl MIA/CD-RAP während der gesamten Chondrogenese exprimiert wird, entwickeln sich MIA-*knockout*-Mäuse normal und zeigen neben ultrastrukturellen Veränderungen der Knorpelmatrix keine Fehlbildungen des Skeletts oder anderer Organe. Um den Grund für diesen annähernd normalen Phänotyp des adulten Skelettsystems von MIA-*knockout*-Mäusen zu erforschen, wurden die molekularen Abläufe im Prozess der enchondrale Ossifikation von MIA-defizienten-Embryonen *in vivo* untersucht. Es wurden redundante Mechanismen erwartet, welche den MIA/CD-RAP-Verlust kompensieren. *In situ* Hybridisierungen zeigten eine vergrößerte Zone an proliferierenden Kollagen Typ II- und Sox9-exprimierenden Chondrozyten in der Wachstumsfuge von 15,5 Tage alten MIA-defizienten-Embryonen. Gleichzeitig war der Bereich an Kollagen Typ X-exprimierenden hypertrophen Chondrozyten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert, was auf eine Verzögerung der hypertrophen Differenzierung schließen ließ. *In vitro* Experimente an mesenchymalen Stammzellen konnten eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren Sox9 und Sox6 bestätigen, was auf eine redundante Regulation aufgrund einer verminderten p54^{nrb}-Expression zurückzuführen war. Sox9 und Sox6 halten Chondrozyten in Proliferation und inhibieren deren hypertrophe Differenzierung. Erstaunlicherweise wurde an Tag 16,5 der Embryonalentwicklung die zunächst verzögerte Differenzierung von Chondrozyten der Wachstumsfuge durch einen vergrößerten Bereich an hypertrophen Chondrozyten kompensiert. Dies war vermutlich auf eine Verminderung der transkriptionellen Aktivität von CREB und AP1 zurückzuführen. Die Veränderung der CREB- und AP1-Aktivität könnte somit als sekundärer redundanter Mechanismus in MIA-*knockout*-Mäusen dienen, welcher der zunächst gehemmten enchondrale Ossifikation entgegenwirkt und letztendlich ein normal entwickeltes Skelett ermöglicht. Auf welche funktionelle Weise diese Gegenregulation stattfindet und wie MIA/CD-RAP die CREB- bzw. AP1-Aktivität moduliert, muss allerdings in weiteren Experimenten noch geklärt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP für die Chondrozytendifferenzierung benötigt wird. Die Effekte auf die Differenzierung werden dabei über p54^{nrb} vermittelt.

1. Einleitung

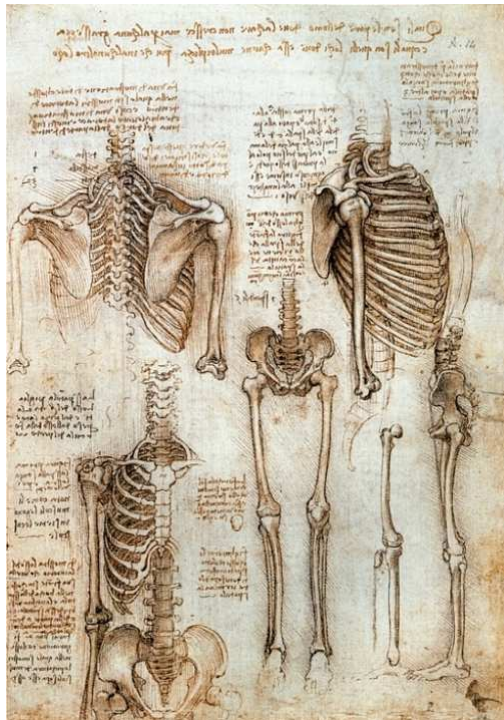


Abbildung 1: Anatomische Studien des menschlichen Skeletts. Zeichnung von Leonardo da Vinci um 1510.

Das Wort Skelett leitet sich von dem griechischen Wort *skeletós* ab, was so viel wie „ausgetrockneter Körper“ oder „Mumie“ bedeutet. Das Skelett von Wirbeltieren (Vertebraten) besteht aus einzelnen Knochen, die zusammen mit Bändern, Bandscheiben und Gelenken dem Körper Gestalt und Stabilität verleihen (Stützapparat) (Abbildung 1). Neben der Stützfunktion dient das Skelett der Bewegung bzw. Fortbewegung des Körpers (Bewegungsapparat). Als Ansatzpunkt der Skelettmuskulatur können die Knochen innerhalb spezieller Gelenke gegeneinander bewegt werden. Das Skelett gewährt darüber hinaus Schutz vor mechanischen Einwirkungen für innere Organe und für das Gehirn. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des

Stütz- und Bewegungsapparats ist der Knorpel, der die Gelenksflächen der Knochen auskleidet (Gelenksknorpel). Er sorgt mit seiner glatten

Oberfläche für die reibungsarme Beweglichkeit der Gelenke und dient durch seine Druckelastizität der Stoßdämpfung. Knorpel besteht aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und der extrazellulären Knorpelmatrix. Sie hat einen hohen Wasseranteil von bis zu 70 % und weist keine Blutgefäße oder Nerven auf. Die Proteinbestandteile der Matrix sind vor allem Kollagene, Proteoglykane und Hyaluronsäure. Anhand der jeweiligen Zusammensetzung der Knorpelmatrix wird zwischen hyalinen-, elastischen- und Faserknorpel unterschieden.

Das Skelett der Vertebraten wird in das axiale und das appendikuläre Skelett unterteilt. Das axiale Skelett umfasst den Schädel, die Wirbelsäule, die Rippen und das Brustbein. Das appendikuläre Skelett besteht aus den Knochen der Extremitäten, dem Schultergürtel sowie dem Beckengürtel. Die Entwicklung des Vertebratenskeletts findet durch zwei verschiedene Mechanismen statt: Der direkten desmalen- und der indirekten chondralen Ossifikation (Knochenbildung) (Abbildung 2) (Gilbert, 1997).

In der desmalen Ossifikation differenzieren kondensierte mesenchymale Zellen direkt zu Osteoblasten, welche Knochengrundsubstanz (Osteoid) sezernieren und somit den Knochen aufbauen (Ossifikation). Auf diese Weise entsteht der größte Teil des Schädelknochens, Teile des Unterkiefers und Teile des Schlüsselbeins (Hall, 1988).

Das appendikuläre und der Großteil des axialen Skeletts entwickelt sich durch chondrale Ossifikation. Man unterscheidet hier zwischen der perichondralen Ossifikation, der

Verknöcherung von außen, und der enchondralen Ossifikation, der Verknöcherung von innen her. Bei der perichondralen Ossifikation reifen kondensierte mesenchymale Zellen zunächst zu perichondralen Zellen. Sie bilden das Perichondrium (Knorpelhaul) und differenzieren direkt zu knochenbildenden Osteoblasten. In der enchondralen Ossifikation entsteht zunächst eine knorpelige Skeletanlage (Knorpelanlage), welche als Vorlage für die Knochenbildung dient (Abbildung 2) (Hinchcliffe und Johnson, 1980; Erlebacher *et al.*, 1995).

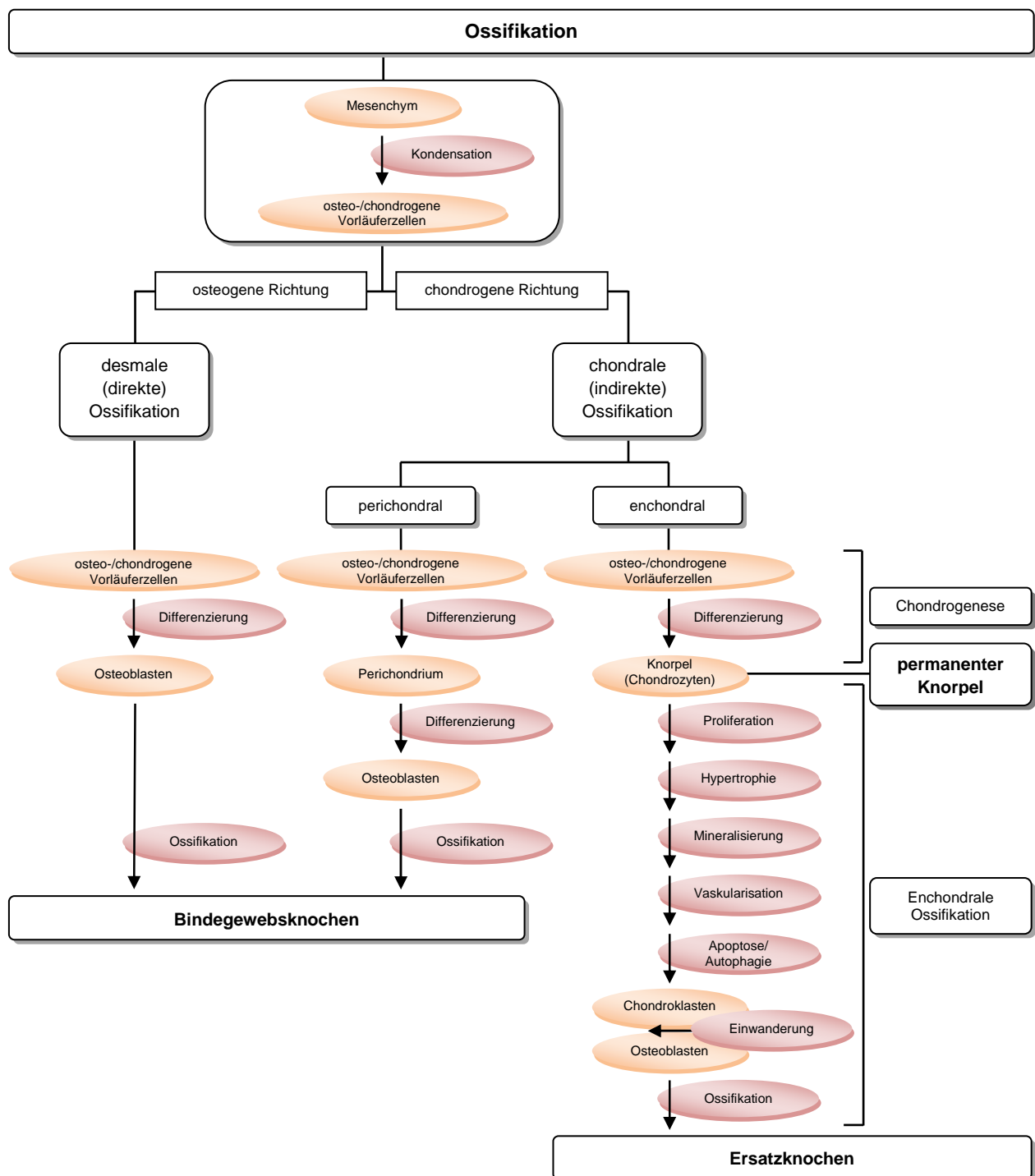


Abbildung 2: Schematische Darstellung der beiden Wege der Knochenentstehung. Alle Formen der Ossifikation haben gemein, dass sie aus kondensierten mesenchymalen Zellen hervor gehen. Osteo-/chondrogene Vorläuferzellen haben die Fähigkeit sich in die osteogene Richtung oder in die chondrogene Richtung zu entwickeln. Pfeile stellen einen Vorgang dar.

Die Knorpelanlage ist für die Bestimmung der Form und Größe der später vollständig entwickelten Röhrenknochen entscheidend. Die Knorpelanlage entsteht in einem Prozess namens Chondrogenese (Knorpelentwicklung). Hierbei differenzieren die kondensierten mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und beginnen Moleküle zu sekretieren, welche die extrazelluläre Matrix (EZM) des Knorpels aufbauen. In der frühen fötalen Entwicklung ist der größte Teil des Skeletts knorpelig. Dieser temporäre Knorpel wird in der späten fötalen Entwicklung und im postnatalen Wachstum schrittweise zu Knochen umgebildet. Hierbei proliferieren die Chondrozyten zunächst und durchlaufen dann eine terminale Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten (Hypertrophie), was mit einem Umbau der EZM assoziiert ist. Die Knorpel-EZM mineralisiert, wird von Blutkapillaren innerviert (Vaskularisation) und durch einwandernde Chondroklasten und Osteoblasten letztendlich durch Knochen ersetzt (Ossifikation) (Hall, 1988; Horton, 1990; Recker, 1992). Die hypertrophen Chondrozyten sterben schließlich ab (Apoptose/Autophagie). Dieser Prozess aus Chondrogenese, Hypertrophie, Mineralisierung, Vaskularisation und Apoptose/Autophagie, gefolgt von Ossifikation wird enchondrale Ossifikation genannt (Caplan und Boyan, 1994). Im Gegensatz dazu bleibt der Knorpel in den Gelenken das ganze Leben unverknöchert und ist daher permanent. Es gibt weitere Vorkommen von sich nicht verknöchernden permanentem Knorpel, wie an den Rippen, der Nase, den Ohrmuscheln, den Knorpelspangen der Luftröhre und den Bandscheiben (Abbildung 2).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Proteins MIA/CD-RAP in der Chondrogenese. Im Bezug auf die Relevanz der Chondrogenese für diese Arbeit soll dieser Prozess im nächsten Abschnitt detailliert erläutert werden. Auf die anschließende enchondralen Ossifikation wird ebenfalls eingegangen. Die parallel ablaufende perichondrale Ossifikation wird dabei nur jeweils kurz erörtert. Die einzelnen Abschnitte der Chondrogenese, sowie der enchondralen Ossifikation, sind in Abbildung 3 auf Seite 10 schematisch dargestellt.

1.1 Die Chondrogenese

1.1.1 Mesenchymale Kondensation

Die Chondrogenese beginnt mit der Migration von undifferenzierten mesenchymalen Zellen an die Stellen des Embryos, an denen später Knochen entstehen sollen. Die Zellen durchlaufen nun einen Kondensationsprozess (Fell, 1925; Searls *et al.*, 1972; Thorogood und Hinchliffe, 1975), indem sich die Zelldichte durch Zellaggregation, aber nicht durch vermehrte Proliferation erhöht (Janners und Searls, 1970; Summerbell und Wolpert, 1972). Zu diesem Zeitpunkt sind bereits Lage, Form und Anzahl der zukünftigen Skelettbestandteile festgelegt (Abbildung 3 A).

Die mesenchymale Kondensation ist entscheidend für die Chondrogenese. Sie wird durch Zell-Zell- (siehe 1.3.1) und Zell-Matrix-Interaktionen (siehe 1.3.2) geregelt und ist mit einer erhöhten Zelladhäsion assoziiert.

Vor der Kondensation besteht die EZM von undifferenzierten mesenchymalen Zellen aus Fibronektin, Kollagen Typ I (Linsenmayer *et al.*, 1973a; Linsenmayer *et al.*, 1973b; Dessau *et al.*, 1980) und Hyaluronsäure (Knudson und Toole, 1985). Mit Beginn der Kondensation kann eine Erhöhung der Hyaluronidaseaktivität, was eine Verminderung von Hyaluronsäuren in der EZM zu Folge hat, beobachtet werden. Dies führt zu einem reduzierten Abstand zwischen den Zellen und ermöglicht somit Zell-Zell Interaktionen (Toole *et al.*, 1972; Toole und Linsenmayer, 1977; Knudson und Toole, 1987).

Die Schaffung von Zell-Zell-Interaktionen führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen, welche die chondrogene Differenzierung initiieren. Mit der Initiation der Kondensation treten des Weiteren zwei Zell-Adhäsionsmoleküle auf: N-Cadherin (Neural cadherin) und N-CAM (Neural cell adhesion molecule) (siehe 1.3.1). Beide Moleküle werden in kondensierten mesenchymalen Zellen exprimiert und sind in sich differenzierenden Chondrozyten nicht mehr vorhanden (Oberlender und Tuan, 1994b; Tavella *et al.*, 1994). Außerdem ist die Ausbildung von *Gap junctions*, welche den Transfer von Signalmolekülen zwischen den Zellen und somit die interzelluläre Kommunikation fördern, beschrieben (Kelley und Fallon, 1978; Zimmermann *et al.*, 1982; Kelley und Fallon, 1983; Zimmermann, 1984; Coelho und Kosher, 1991).

Zusätzlich zu den Zell-Zell-Interaktionen spielen auch Zell-Matrix-Interaktionen eine wichtige Rolle in der mesenchymalen Kondensation. Bestandteile der EZM, die an diesem Prozess beteiligt sind, sind Integrine, Fibronektin (siehe 1.3.2) und Kollagen Typ I. Fibronektin und Kollagen Typ I sind gleichmäßig im Interzellularraum des Mesenchyms verteilt (Dessau *et al.*, 1980). Mit dem Einsatz der Kondensation erhöht sich die Kollagen Typ I- und Fibronektinexpression am Ort der Kondensation. Dabei bleibt Fibronektin während der kompletten Chondrogenese sowie im adulten Knorpel in der Matrix vorhanden (Dessau *et al.*, 1980; Melnick *et al.*, 1981). Kollagen Typ I verschwindet mit Beginn der Differenzierung zu Chondrozyten aus der EZM und wird schrittweise durch Kollagen Typ II ersetzt (siehe 1.1.2) (Dessau *et al.*, 1980).

Ein weiteres EZM Glykoprotein ist Tenascin-C, welches mit Beginn der mesenchymalen Kondensation exprimiert wird (Mackie *et al.*, 1987; Mackie und Murphy, 1998). Mit zunehmender Differenzierung vermindert sich die Tenascin-C-Expression (Mackie und Murphy, 1998) und ist in voll differenziertem Knorpel nur auf das Perichondrium beschränkt (Mackie *et al.*, 1987). *In vitro* Studien zeigten eine erhöhte Kondensation von mesenchymalen Zellen auf Tenascin beschichteten Oberflächen. Zudem führt Tenascin in der Zellkultur zu einer Inhibition der Zellhaftung an Fibronektin beschichtete Oberflächen. Tenascin-C moduliert somit

Fibronektin-Zell-Interaktionen in der Chondrogenese und fördert die Kondensation (Mackie *et al.*, 1987).

1.1.2 Differenzierung zu Chondrozyten

Die kondensierten mesenchymalen Zellen haben immer noch die Fähigkeit sich zu Osteoblasten (osteogene Richtung) oder zu Chondrozyten (chondrogene Richtung) zu differenzieren, weshalb sie auch als osteo-/chondrogene Vorläuferzellen bezeichnet werden (Abbildung 2) (Ducy *et al.*, 1997; Karsenty, 2008).

In der chondralen Ossifikation, d.h. in der chondrogenen Richtung, differenzieren die Zellen im Zentrum der Kondensation zu Chondrozyten, was durch eine Veränderung der Zusammensetzung der EZM gekennzeichnet ist. Diese sich entwickelnden Chondrozyten werden auch Chondroblasten genannt. Gleichzeitig differenzieren die Zellen am äußeren Rand der Kondensation, welche die Chondroblasten umgeben, im Rahmen der perichondralen Ossifikation zu flachen, länglichen (fibroblastenähnlich) perichondralen Zellen. Sie bilden das Perichondrium (Knorpelhaut), das die spätere Knorpelanlage umgibt (Abbildung 3 B) (Horton, 1993; Kronenberg, 2003; Hartmann, 2009). Die Chondroblasten beginnen knorpelspezifisches Kollagen Typ II (Kravis und Upholt, 1985; Kosher *et al.*, 1986; Nah *et al.*, 1988; Swiderski und Solursh, 1992b), Kollagen Typ IX (Kulyk *et al.*, 1991; Swiderski und Solursh, 1992a) und XI zu produzieren. Kollagen Typ I wird nicht mehr exprimiert (Ede, 1983). Die Kollagene sorgen für die hohe Stabilität des späteren permanenten hyalinen Knorpels. Außerdem wird das Protein Gla (Hale *et al.*, 1988; Luo *et al.*, 1995), das Proteoglykan Aggrecan (Hascall *et al.*, 1976; Mallein-Gerin *et al.*, 1988; Tsonis und Walker, 1991), das Protein Link (Stirpe und Goetinck, 1989) und das Protein CD-RAP (siehe 1.4) (Dietz und Sandell, 1996) exprimiert und sezerniert. Aggrecan ist einer der Hauptbestandteile des hyalinen Knorpels (Glumoff *et al.*, 1994), welcher durch seine Menge und seiner starken negativen Ladung über eine hohe Wasseraufnahmefähigkeit verfügt. Dies sorgt für die charakteristische gallertige und elastische Knorpelstruktur und ist für die dämpfenden Eigenschaften des Knorpels verantwortlich.

Die Zellen werden somit von ihrer EZM eingeschlossen und nehmen nun ihre charakteristische runde Morphologie an. Man spricht jetzt von Chondrozyten, dem primären Zelltyp des Knorpels, womit die Chondrogenese beendet ist. Die jetzt entstandene Knorpelanlage vergrößert sich durch Proliferation der Chondrozyten und der perichondralen Zellen sowie durch vermehrte Matrixproduktion (Abbildung 3 B). Diese Chondrozyten verbleiben lebenslänglich als Bestandteil des permanenten Knorpels erhalten oder werden im Rahmen der enchondralen Ossifikation durch Knochen ersetzt.

Der Prozess der enchondralen Ossifikation wird im nächsten Abschnitt erläutert.

1.2 Die Enchondrale Ossifikation

1.2.1 Terminale Differenzierung (Hypertrophie und Mineralisierung)

Die Entwicklung von Röhrenknochen beginnt im Zentrum der Knorpelanlage mit dem Austritt der Chondrozyten aus dem Zellzyklus (primäres Ossifikationszentrum) und der weiteren Differenzierung zu postmitotischen prä-hypertrophen Chondrozyten (Abbildung 3 C). Es kommt zu einer schrittweisen Vergrößerung des Zellvolumens um bis das Zehnfache (Hypertrophie), (Bush *et al.*, 2008) bis man von hypertrophen Chondrozyten spricht (Abbildung 3 D). Dieser Prozess ist durch einen Umbau der EZM und einer Mineralisierung der Matrix durch die nun reifen hypertrophen Chondrozyten charakterisiert (Abbildung 3 E) (Poole, 1991).

Diese Veränderungen werden durch die Expression von MMP13 (Matrix metalloprotease 13), Kollagen Typ X (Schmid und Linsenmayer, 1985) und ALP (Alkaline phosphatase) durch die hypertrophen Chondrozyten vermittelt (Mueller und Tuan, 2008). Sie vermindern außerdem die Expression von Kollagen Typ II, welche schließlich komplett abgeschaltet wird.

MMP13 ist für den Umbau der Knorpelmatrix verantwortlich, da es die Hauptbestandteile der Knorpel-EZM, Kollagen Typ II (Inada *et al.*, 2004) und Aggrecan (Fosang *et al.*, 1996), abbaut. Die Ablagerung von Kollagen X in die EZM dient als Gerüst und als Regulator der schrittweisen Mineralisierung (Shen, 2005). Der große Kalziumgradient zwischen einer hohen extrazellulären und einer niedrigen intrazellulären Konzentration ist wahrscheinlich die treibende Kraft der Mineralisierung, da dieser den Influx von Kalziumionen (Ca^{2+}) auslöst (Bawden, 1989; Grandolfo *et al.*, 1992). Mit zunehmender Kalziumkonzentration (Iannotti *et al.*, 1994) beginnt die Mineralisierung der Knorpelmatrix mit der Sekretion von ALP enthaltenden Matrixvesikeln (MVs) (Anderson, 2003) durch die Chondrozyten, welche an die Kollagen X Matrix verankert werden (Shen, 2005). In der ersten Phase der Mineralisierung dephosphoryliert ALP Pyrophosphat (PP_i) zu Phosphat (PO_4^{3-}), welches zusammen mit einströmenden Ca^{2+} -Ionen und Hydroxidionen (OH^-) zur Bildung von Hydroxyapatit [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] in den MVs führt (Balcerzak *et al.*, 2003). In der zweiten Phase der Mineralisierung kommt es zu einem Eindringen der Hydroxyapatit Kristalle in den extrazellulären Raum, was der Beginn der Matrixmineralisierung ist.

Die starke Volumenzunahme der hypertrophen Chondrozyten ist hauptsächlich auf Osmose zurückzuführen (Buckwalter *et al.*, 1986). Das osmotische Quellen kann die Folge einer Erhöhung der zytoplasmatischen Konzentration oder einer Verminderung der extrazellulären Osmolarität sein. Es kommt dabei zu einer Aquaporin-abhängigen Bewegung von Wasser in die Zelle (Wang und Zhu, 2011), um iso-osmotische Bedingungen wiederherzustellen. Die Erhöhung der intrazellulären Ionenkonzentration kann durch einen aktiven Transport über die Zellmembran durch den Na-K-Cl Ko-Transporter NKCC1 vermittelt werden (Bush *et al.*, 2010). Nichtsdestotrotz ist bis jetzt noch nicht komplett verstanden, ob die Expression der Marker der

terminalen Differenzierung zur Volumenzunahme führen oder ein Ergebnis der Volumenzunahme sind (Studer *et al.*, 2012).

Unreife proliferierende Chondrozyten werden auf die Enden der Knorpelanlage beschränkt. Angrenzend an die prä-hypertrophen Chondrozyten differenzieren die Zellen des Perichondriums im Zuge der perichondralen Ossifikation zu Osteoblasten (Abbildung 3 C) und bilden damit das Periost (Knochenhaut). Diese sezernieren eine kalzifizierte Knochenmatrix, was zur Ausbildung einer knöchernen Manschette (Abbildung 3 D) um den knorpeligen Kern des zukünftigen Röhrenknochens führt (Caplan und Pechak, 1987).

1.2.2 Vaskularisation, Apoptose und Ossifikation

Durch die Sezernierung des angiogenetischen Faktors VEGF (Vascular endothelial growth factor) von reifen hypertrophen Chondrozyten kommt es zu einem Einwachsen von Kapillargefäßen (Vaskularisation) aus dem Periost in das primäre Ossifikationszentrum, d.h. in die mineralisierte Matrix der reifen hypertrophen Chondrozyten (Abbildung 3 E) (Gerber *et al.*, 1999; Haigh *et al.*, 2000). Die terminal differenzierten reifen hypertrophen Chondrozyten gehen schließlich in Apoptose (Gibson, 1998; Adams und Shapiro, 2002). Hier wird mittlerweile jedoch die Hypothese vertreten, dass es sich nicht um Apoptose sondern um Autophagie handelt (Roach und Clarke, 1999; Roach *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2005).

Über die Kapillargefäße wandern Chondroklasten und Osteoblasten in das primäre Ossifikationszentrum ein. Die Chondroklasten resorbieren zum Großteil die mineralisierte Knorpelmatrix, wobei die Osteoblasten die Reste der Knorpelmatrix als Gerüst für den Aufbau von Knochenmatrix nutzen (Ossifikation) (Erlebacher *et al.*, 1995). Während diese Prozesse im Zentrum der Knorpelanlage stattfinden, vergrößert sich diese jedoch weiterhin durch kontinuierliche Proliferation von Chondrozyten an den Enden der Knorpelanlage (Abbildung 3 E).

Dieser Prozess aus Hypertrophie, Mineralisierung, Apoptose und Ossifikation bewegt sich vom Zentrum des Röhrenknochens nach außen zu den beiden Enden (Epiphysen). Es kommt dort zur Ausbildung von embryonalen Wachstumsfugen, welche die distalen knorpeligen Epiphysen von der medialen knöchernen Diaphyse trennen (Abbildung 3 E). Auf die embryonale Wachstumsfuge soll im nächsten Abschnitt kurz eingegangen werden.

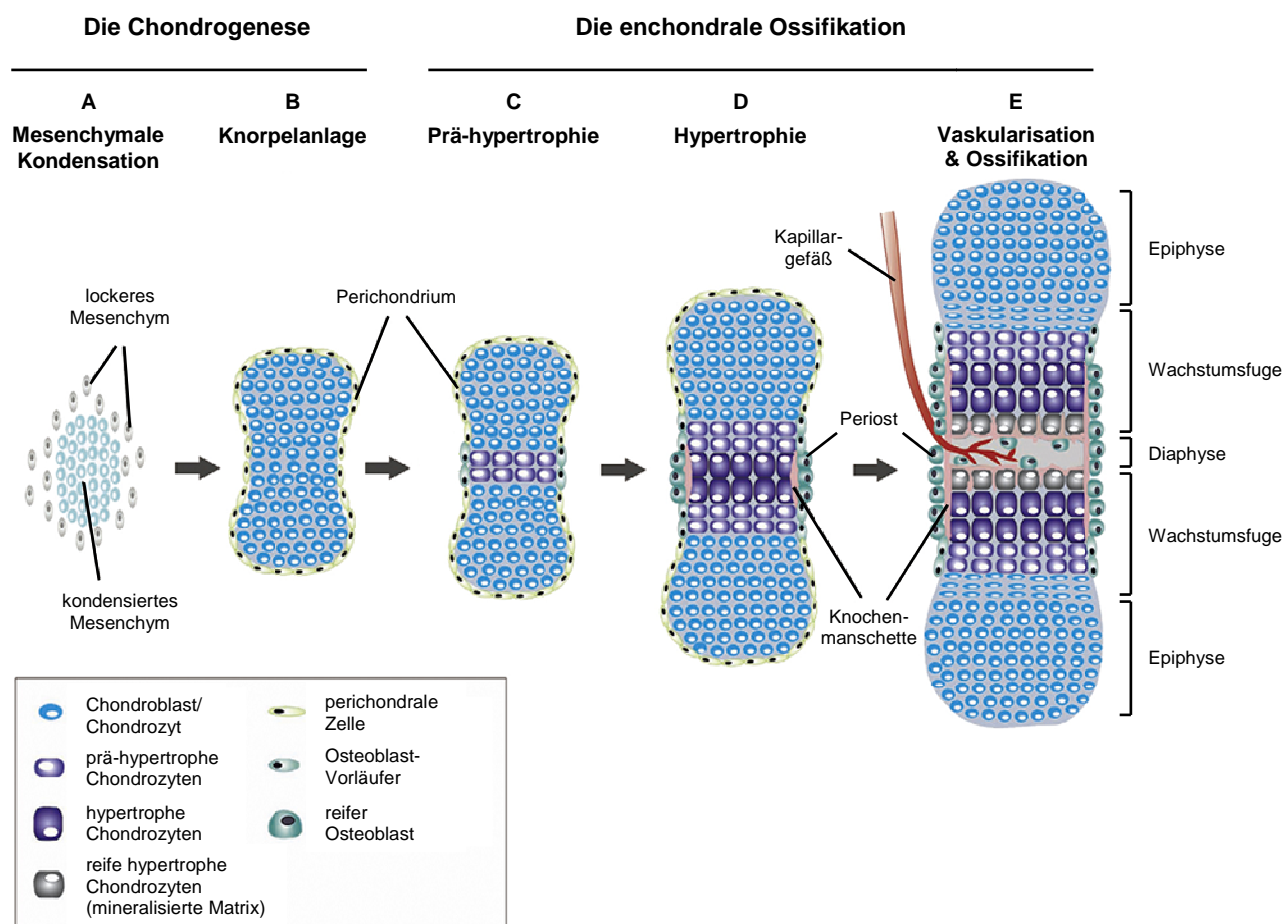


Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation in Röhrenknochen. (A) Die Chondrogenese beginnt mit der Kondensation von undifferenzierten mesenchymalen Zellen, (B) welche zu Chondrozyten differenzieren und die Knorpelanlage bilden. Zellen am Rand der Kondensation differenzieren zu perichondralen Zellen, welche als Perichondrium die Knorpelanlage umgeben (perichondrale Ossifikation). (C) Mit Beginn der enchondralen Ossifikation hören Zellen im Zentrum der Knorpelanlage auf zu proliferieren und differenzieren zu prä-hypertrophen Chondrozyten (primäres Ossifikationszentrum). Die an die prä-hypertrophen Chondrozyten angrenzenden perichondralen Zellen differenzieren zu Osteoblasten. (D) Die reifen Osteoblasten sezernieren eine Knochenmatrix und bilden somit eine knöcherne Manschette um den sich entwickelnden Röhrenknochen (perichondrale Ossifikation). Die prä-hypertrophen Chondrozyten reifen schrittweise weiter zu hypertrophen Chondrozyten, welche eine spezielle Matrix sezernieren, die schließlich mineralisiert. (E) Die reifen hypertrophen Chondrozyten induzieren das Einwachsen von Kapillargefäßen in die mineralisierte Matrix, über die Osteoblasten einwandern und die Knochenmatrix aufbauen. Die darauffolgende Ausbildung von sekundären Ossifikationszentren in den Epiphysen ist nicht dargestellt. Verändert nach Hartmann, 2009.

1.2.3 Die Wachstumsfuge

Um das Längenwachstum der Röhrenknochen zu ermöglichen, gibt es weiterhin proliferierende Chondrozyten in den embryonalen Wachstumsfugen an den Enden der Röhrenknochen. Die Wachstumsfuge spiegelt in einem Verlauf von der Epiphyse zur Diaphyse die einzelnen Abschnitte der Chondrozytendifferenzierung der enchondralen Ossifikation wieder (siehe 1.2) (Poole, 1991).

Am oberen Ende der Wachstumsfuge und am weitesten von der Ossifikationsfront entfernt befinden sich in der Gelenksregion (periartikular) runde Chondrozyten, welche nur wenig

proliferieren (Reserve Chondrozyten). Sie dienen als Vorläuferzellen für die darunter liegenden stark proliferierenden, Knorpelmatrix produzierenden Chondrozyten. Diese lagern sich zur Diaphyse hin säulenartig zusammen und nehmen eine scheibenförmige Zellform an (Säulenartige-Chondrozyten). Chondrozyten, die die Proliferation einstellen, vergrößern stufenweise ihr Volumen und differenzieren zu prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, welche eine bestimmte EZM sekretieren, die letztendlich mineralisiert. Es kommt zur Einsprossung von Blutkapillaren in die mineralisierte Matrix der reifen hypertrophen Chondrozyten, welche schließlich in Apoptose/Autophagie gehen. Die über die Blutgefäße einwandernden Chondroklasten und Osteoblasten ersetzen den mineralisierten Knorpel durch Knochen (primärer Spongiosa) (Abbildung 4).

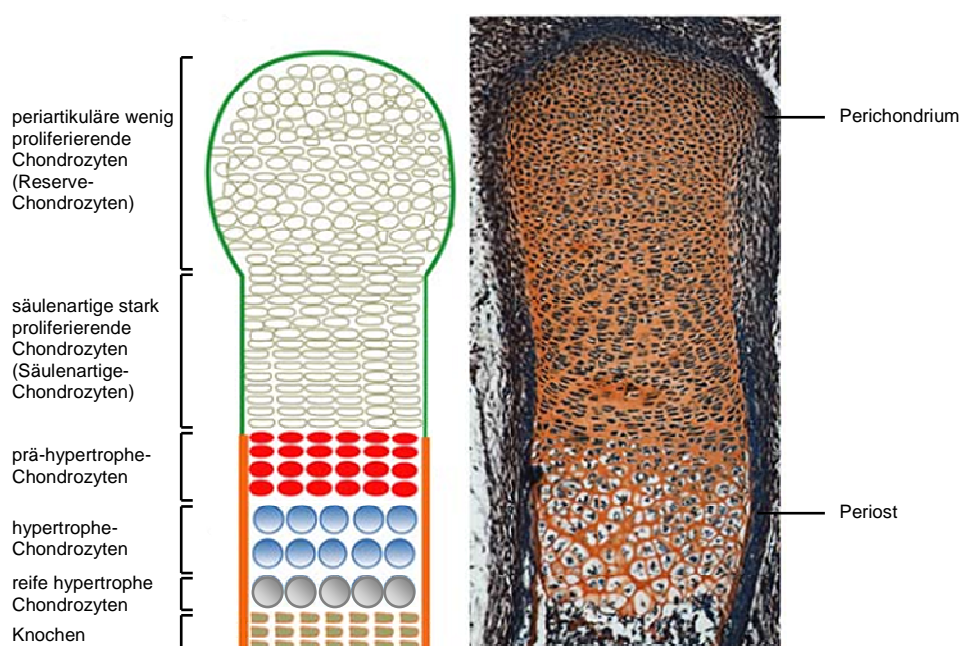


Abbildung 4: In der embryonalen Wachstumsfuge können verschiedenen Chondrozytenpopulationen morphologisch unterschieden werden. (A) Schematische Darstellung der einzelnen Subpopulationen von Chondrozyten in einem Längsschnitt durch eine embryonale Wachstumsfuge. **(B)** Safranin-Weigert-Färbung eines Längsschnittes durch den Röhrenknochen eines 16,5 Tage alten Mausembryos zeigt die charakteristische Knorpelmorphologie. Verändert nach Wuelling und Vorkamp, 2010.

Während der postnatalen Entwicklung bilden sich an den Epiphysen des Röhrenknochens sekundäre Ossifikationszentren innerhalb des Bereichs der Reserve Chondrozyten. Hier wird in dem oben beschriebenen Prozess (siehe 1.2.1 und 1.2.2) der Knorpel schrittweise durch Knochen ersetzt. Die sekundären Ossifikationszentren dringen schrittweise in den verbleibenden Knorpel ein, bis er letztendlich bis auf die Gelenksflächen komplett durch Knochen ersetzt ist. Zwischen der verknöcherten Region des primären Ossifikationszentrums, im Bereich des Knochenschafts (Diaphyse) und den beiden sekundären Ossifikationszentren, im Bereich der Knochenenden (Epiphyse) bleiben Chondrozyten zurück, welche die postnatale Wachstumsfuge bilden. Hier findet weiterhin in dem oben beschriebenen Prozess das Längenwachstum des postnatalen Röhrenknochens statt (interstitielles Wachstum). Proximal

der Epiphysenfuge wird Knorpel gebildet, der im Zuge der enchondralen Ossifikation zu neuem Knochen umgewandelt wird. Die Diaphyse wird somit länger und die Epiphyse wird dabei nach distal verschoben. Es kommt jedoch zu einer fortschreitenden Abnahme der Chondrozytenproliferation, so dass die Epiphysenfuge immer dünner wird, da Knorpel nicht in dem Maße nachgebildet wird, wie er durch Knochen ersetzt wird. Ist die Epiphysenfuge komplett in Knochen umgewandelt, ist das Längenwachstum abgeschlossen und ein Individuum ausgewachsen. Das Längenwachstum der Röhrenknochen beruht hauptsächlich auf der Proliferationsrate von Chondrozyten, der Volumenzunahme der hypertrophen Chondrozyten und der von ihnen sekretierten Matrix.

Während der embryonalen und postnatalen Entwicklung ist eine strenge Regulation der Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten der Wachstumsfuge nötig, um ein normales Längenwachstum und eine normale enchondrale Ossifikation der Röhrenknochen sicherzustellen. Eine gestörte Proliferation und hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten würde zu Veränderung der Knochenlänge und Stabilität führen.

Die koordinierte Abfolge von Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten wird daher von systemischen Faktoren (Wachstumshormone) und lokal sekretierten parakrinen Faktoren (Signalmoleküle) reguliert. Diese wirken über Rezeptoren, um die intrazelluläre Signalweitergabe und chondrozytenspezifische Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Zu den über den Blutkreislauf verteilten endokrinen Wachstumshormonen, die das Verhalten von Chondrozyten in der Wachstumsfuge regulieren, gehört Somatotropin und die Schilddrüsenhormone, auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll. Zu den lokal sekretierten parakrinen Signalmolekülen gehören unter anderem Ihh, PTHrP, die BMPs, TGF- β s, Wnts und FGFs (siehe 1.3.3). Transkriptionsfaktoren, die wichtige Rollen in der Regulation der chondrozytenspezifischen Genexpression spielen, sind die Sox-Transkriptionsfaktoren, Runx2 und Ap-2 (siehe 1.3.4). In den nächsten Abschnitten soll auf die Rolle dieser Faktoren in der Regulation der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation genauer eingegangen werden.

Zunächst werden jedoch die an der mesenchymalen Kondensation beteiligten Faktoren detailliert erläutert.

1.3 Die Regulation der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation

1.3.1 Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle

Zell-Adhäsion wird durch zwei große Gruppen von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen vermittelt. Der Ca^{2+} -abhängigen Gruppe von transmembranen Glykoproteinen, den Cadherinen und der Ca^{2+} -

unabhängigen Gruppe der Immunglobulin-Familie von Membran Glykoproteinen, den CAMs (Cell adhesion molecules) (Edelman, 1986; Chothia und Jones, 1997). Zwei Adhäsionsmoleküle, N-Cadherin (Neural cadherin) und N-CAM (Neural cell adhesion molecule), spielen in der mesenchymalen Kondensation eine wichtige Rolle (Widelitz *et al.*, 1993; Oberlender und Tuan, 1994a). Beide Moleküle werden mit Initiation der Kondensation von mesenchymalen Zellen exprimiert, gehen jedoch mit zunehmender Chondrozytendifferenzierung wieder verloren (Tavella *et al.*, 1994).

N-Cadherin

Bei den Cadherinen handelt es sich um Ca^{2+} -abhängige einfach-transmembrane Glykoproteine, welche die Zell-Zell-Adhäsion über die Protein-Protein Interaktion der extrazellulären Domänen von zwei Cadherinen verschiedener Zellen vermitteln. Sie besitzen eine hoch konservierte zytoplasmatische Domäne, welche für die Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett über Catenine verantwortlich ist (Suzuki, 1996).

N-Cadherin wird während der Embryogenese in den sich entwickelnden Extremitätenknospen exprimiert, was für eine Rolle während der zellulären Kondensation spricht (Oberlender und Tuan, 1994a). Wie *in vivo* Untersuchungen zeigten ist die N-Cadherin-Expression in mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen vor der Kondensation sehr gering. Diese steigt jedoch mit der Kondensation in den mesenchymalen Zellen drastisch an. Mit zunehmender Differenzierung fällt die Expression wieder ab und ist im reifen Knorpel, bis auf die ihn umgebenden perichondralen Zellen, nicht mehr vorhanden (Oberlender und Tuan, 1994a; Oberlender und Tuan, 1994b). Dies konnte *in vitro* anhand von Hochdichtekulturen (Micromass Kulturen) von mesenchymalen Zellen, in der die Stufen der Chondrogenese *in vitro* untersucht werden können (Ahrens *et al.*, 1977), bestätigt werden. Sich aggregierende Zellen im Zentrum dieser Kulturen zeigen eine Erhöhung der N-Cadherin-Expression, welche mit Beginn der Differenzierung dieser Zellen wieder verloren geht (Oberlender und Tuan, 1994a). Dies spricht für eine Abhängigkeit der mesenchymalen Kondensation von N-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten. Studien von Oberlender und Tuan, in denen die N-Cadherin Funktion gehemmt wurde, konnten diese Theorie bestätigen. Unter Verwendung eines inhibitorischen monoklonalen Antikörpers kommt es zu einer Hemmung der mesenchymalen Kondensation sowie der Chondrogenese *in vivo* und *in vitro* (Oberlender und Tuan, 1994b). Diese Ergebnisse korrelieren mit den zuvor gemachten Beobachtungen von San Antonio und Tuan. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass vor der Kondensation von außen zugeführtes Ca^{2+} die Chondrogenese fördert. Ca^{2+} hatte aber nur geringe Effekte, wenn man es nach der Kondensation zugegeben hatte (San Antonio und Tuan, 1986).

Diese Daten bestätigen die eindeutige Funktion von N-Cadherin in der mesenchymalen Kondensation und der Chondrogenese.

N-CAM

Das Glykoprotein N-CAM ist das zweite Adhäsionsmolekül, welches eine wichtige Funktion in der mesenchymalen Kondensation spielt. Die N-CAM-Expression in den sich entwickelnden Extremitätenknospen folgt der eben beschriebenen N-Cadherin-Expression, wobei die N-CAM-Expression erst nach der N-Cadherin-Expression einsetzt (Tavella *et al.*, 1994). N-CAM wird in der frühen Extremitätenentwicklung *in vivo* von allen Zellen exprimiert (Chuong *et al.*, 1993). Mit Einsetzen der Kondensation von mesenchymalen Zellen steigt die Expression von N-CAM, sinkt aber mit zunehmender Differenzierung dieser Zellen wieder. Im adulten Knorpel ist N-CAM verloren, es wird jedoch weiterhin stark im umgebenden Perichondrium exprimiert (Chuong *et al.*, 1993; Widelitz *et al.*, 1993). Dieses *in vivo* Expressionsprofil konnte *in vitro* in Micromass Kulturen bestätigt werden. Hier konnte eine Erhöhung der N-CAM-Expression in kondensierten mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden, mit einem sie umgebenden Bereich mit mittlerer Expression. Mit Differenzierung dieser kondensierten Zellen verlieren sie die N-CAM-Expression im Zentrum, wobei die N-CAM-Expression in der Peripherie erhalten bleibt (Widelitz *et al.*, 1993). Die funktionelle Rolle von N-CAM in der mesenchymalen Kondensation und der Chondrogenese wurde per *in vitro* Studien unter Verwendung eines inhibitorischen Antikörpers untersucht. Mesenchymale Zellen aus den Extremitätsknospen von Hühnerembryonen zeigten eine Verminderung der Aggregation und des Ausmaßes der Chondrozytendifferenzierung bei Inkubation mit dem anti-N-CAM-Antikörper (Chuong *et al.*, 1993; Widelitz *et al.*, 1993). Die Überexpression von N-CAM in Micromass Kulturen führt zu einer gesteigerten Aggregation von mesenchymalen Zellen, welche chondrogen differenzieren (Widelitz *et al.*, 1993). N-CAM ist somit ein essenzielles Adhäsionsmolekül in der Kondensation von mesenchymalen Zellen und der Initiation der Chondrogenese.

1.3.2 Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle

Die extrazelluläre Matrix ist ein weiterer wichtiger Faktor während der mesenchymalen Kondensation. Sie erfüllt nicht nur in der Zelladhäsion eine wichtige Rolle, sondern vermittelt auch Signale aus der Zellumgebung zum Zytoskelett, welche über die Aktivierung von komplexen Signaltransduktionskaskaden im Zytoplasma in den Zellkern gelangen.

Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, welche die Verbindung des intrazellulären Aktin-Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix vermitteln. Sie setzen sich aus einer alpha und einer beta Untereinheit zusammen, wovon bisher 19 alpha und 8 beta Untereinheiten bekannt sind, welche sich zu 25 verschiedenen Integrinrezeptoren zusammen setzen können (Humphries, 2000). Die Untereinheiten bestehen jeweils aus einer langen

extrazellulären Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne, welche für die Verbindung der EZM mit dem Aktin-Zytoskelett wichtig ist. Durch die Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne können somit Signale über eine Signaltransduktionskaskade in die Zelle übertragen werden (Humphries, 1996; Takada *et al.*, 1997).

Innerhalb der beta Untereinheiten spielt vor allem das Integrin beta 1 in der Chondrogenese eine wichtige Rolle, da es zusammen mit bestimmten alpha Untereinheiten den Kontakt der Chondrozyten mit den EZM-Bestandteilen Kollagen Typ I, Typ II und Typ X sowie Fibronektin herstellt (Enomoto *et al.*, 1993; Luckman *et al.*, 2003). Die bedeutendste alpha Untereinheit, welche an der Bindung an Kollagen Typ II beteiligt ist, ist das Integrin alpha 3, da es im Knorpel exprimiert wird (Salter *et al.*, 1992; Enomoto *et al.*, 1993; Shakibaei, 1995). Von Integrin alpha 1 beta 1 konnte gezeigt werden, dass es als Rezeptor für Kollagen Typ I dient (Kramer und Marks, 1989; Enomoto *et al.*, 1993).

Mit Beginn der Differenzierung von kondensierten mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten kommt es zu einer Veränderung in der Kollagen-Expression von Typ I zu Typ II (Ede, 1983; Kosher *et al.*, 1986). Dieser Übergang von Kollagen Typ I zu Typ II geht einher mit einer Veränderung der Expression von Integrin alpha 1 beta 1 hin zu Integrin alpha 3 beta 1, was auf einen Beginn der Differenzierung deutet, und vermag die zelluläre Differenzierung zu fördern (Shakibaei *et al.*, 1995). Im Verlauf der Chondrozytendifferenzierung ist Integrin alpha 5 beta 1 das überwiegende Integrin (Shakibaei und Merker, 1999), welches als Rezeptor für das EZM-Protein Fibronektin den Kontakt zwischen EZM und sich differenzierenden Chondrozyten herstellt. *In vitro* Studien von Shakibaei, in denen mesenchymale Zellen für sieben Tage mit inhibitorischen Antikörpern gegen Integrin beta 1, Integrin alpha 1 oder Integrin alpha 5 behandelt wurden konnte zeigen, dass vor allem die Integrin beta 1 Untereinheit eine entscheidende Rolle in der frühen Chondrozytendifferenzierung spielt (Shakibaei, 1998). Die Inhibition der Integrin beta 1-Aktivität an Tag eins bis drei hemmt die Differenzierung zu Chondrozyten und die Ausbildung der Knorpelmatrix, indessen konnte die Inhibition der Integrin alpha 1 oder Integrin alpha 5-Aktivität die Differenzierung nicht beeinflussen (Shakibaei, 1998).

Fibronektin

Fibronektin ist ein homodimeres Glykoprotein der EZM, bestehend aus zwei stabförmigen Polypeptidketten, welche nahe des C-terminalen Endes durch Disulfidbrücken verbunden sind. Fibronektin spielt eine wichtige Rolle in Zell-Matrix und Matrix-Matrix Interaktionen, Migration und Differenzierung.

In sich entwickelnden Extremitätenknospen von Hühnerembryonen ist Fibronektin im Interzellularraum von mesenchymalen Zellen vor der Kondensation gleichmäßig verteilt (Dessau *et al.*, 1980). Mit Beginn der Kondensation kommt es am Ort der zellulären

Kondensation zu einer Erhöhung der Fibronektinexpression im Vergleich zum umgebenen lockeren Mesenchym. Diese Expression erreicht dabei ihr Maximum mit Beginn der Differenzierung (Dessau *et al.*, 1980; Kulyk *et al.*, 1989b). Dies konnte *in vitro* in Micromass Kulturen aus mesenchymalen Zellen, welche aus Extremitätenknospen von Hühnerembryonen isoliert wurden, bestätigt werden. Hier kommt es zu einer vier- bis fünffachen Erhöhung der Fibronektin mRNA- und Proteinexpression in mesenchymalen Zellen mit Beginn der Kondensation (Kulyk *et al.*, 1989b). Mit zunehmender Matrixproduktion scheint Fibronektin zu verschwinden. Verdaut man die Extremitätenknospen jedoch mit Hyaluronidasen, kann Fibronektin in der Knorpelmatrix nachgewiesen werden (Melnick *et al.*, 1981; Kosher *et al.*, 1982). Fibronektin wird somit durchgehend in der Chondrogenese exprimiert und bleibt in adulten Knorpel als Bestandteil der EZM erhalten.

Fibronektin könnte eine matrixvermittelte Ortsveränderung (Translokation) der mesenchymalen Zellen während der Kondensation über dessen aminoterminalen Heparin-Bindedomäne ermöglichen (Frenz *et al.*, 1989). Es konnte außerdem eine Erhöhung der Zellhaftung an Kollagen durch Fibronektin gezeigt werden. Dies deutet auf eine vorübergehende Rolle in der Zell-Matrixinteraktion, was die Kondensation in der Chondrogenese fördert (Dessau *et al.*, 1980).

Interessanterweise verändert sich während der Chondrogenese die Fibronektinstruktur: Mesenchymales Fibronektin enthält die beiden Exone IIIA und IIIB (B+A+). Dem von Chondrozyten exprimierten Fibronektin fehlt jedoch das Exon IIIA (B+A-) (Bennett *et al.*, 1991; Gehris *et al.*, 1996; Gehris *et al.*, 1997). Die Expression dieser alternativen Formen von Fibronektin deuten auf eine Beteiligung an der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondroblasten hin (Hickok *et al.*, 1998). Dies erfolgt wahrscheinlich über die Aktivierung von Signalwegen vermittelt durch den Fibronektinrezeptor Integrin alpha 5 beta 1 und dessen assoziierte Kinase ILK (Integrin linked kinase), was zur Transkription von Zielgenen führt. Auf diese Signalkaskaden soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden.

1.3.3 Lokal sekretierte parakrine Signalmoleküle

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den wichtigsten und am besten erforschten lokalen parakrinen Signalmolekülen. Es soll dargestellt werden, wie diese verschiedenen Signalwege interagieren und über die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren die Chondrogenese und die enchondrale Ossifikation auf molekularer Ebene steuern.

Ihh und PTHrP

Ihh (Indian hedgehog) ist ein Hauptregulator der enchondralen Ossifikation, da es die Proliferation und terminale Differenzierung (Hypertrophie) der Chondrozyten, sowie die

Differenzierung der Osteoblasten reguliert. Ihh ist ein Mitglied der hedgehog-Protein Familie von sekretierten Signalmolekülen zu der noch die Signalmoleküle Shh (Sonic hedgehog) und Dhh (Desert hedgehog) gehören (Echelard *et al.*, 1993). Während der enchondralen Ossifikation wird Ihh von postmitotischen prä-hypertrophen Chondrozyten und von hypertrophen Chondrozyten exprimiert und sezerniert (Vortkamp *et al.*, 1996). Ihh bindet an seinen Rezeptor Ptc-1 (Patched-1), was zur Aktivierung des Transmembranproteins Smo (Smoothed) führt. Aktiviertes Smo steuert dann eine Signaltransduktionskaskade, welche die Degradation des Transkriptionsfaktors Gli (Glioma-associated oncogene homolog) verhindert (Goodrich *et al.*, 1996). Das Protein Gli diffundiert in den Zellkern und reguliert dort die Expression bestimmter Zielgene. Ptc-1 und Gli werden im Perichondrium exprimiert, was darauf schließen lässt, dass der Effekt von Ihh durch das Perichondrium vermittelt wird (Vortkamp *et al.*, 1996).

Ihh ist essenziell für die Ausbildung der Knochenmanschette, welche die hypertrophen Chondrozyten umgibt, bevor sich das primäre Ossifikationszentrum ausbildet (Nakamura *et al.*, 1997; St-Jacques *et al.*, 1999). Ihh fördert hierbei die Differenzierung von knochenbildenden Osteoblasten (Chung *et al.*, 2001). Dies ist auch auf Beobachtungen in Ihh-knockout (Ihh^{-/-}) Mäusen zurückzuführen, in denen ein Fehlen von Osteoblasten der Knochenmanschette beobachtet wurde (St-Jacques *et al.*, 1999).

In Ihh^{-/-} Mäusen wurde desweiteren eine verminderte Proliferation von Chondrozyten beobachtet, was zu verkümmerten Knorpelanlagen und schließlich zu Minderwuchs führt (St-Jacques *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Ihh die Proliferation von Chondrozyten auf einem direkten Weg, über eine Expressionsaktivierung des Zellzyklusregulators Cyclin D1, regulieren kann (Vortkamp *et al.*, 1996; Long *et al.*, 2001b).

Ein erhöhter Anteil an postmitotischen hypertrophen Chondrozyten wurde ebenfalls in den Knochen von Ihh^{-/-} Mäusen festgestellt. Dieser ist auf ein Versagen der Stimulation der PTHrP (Parathyroid hormone-related protein) Expression in Chondrozyten von Ihh^{-/-} Mäusen zurückzuführen (Karaplis *et al.*, 1994; St-Jacques *et al.*, 1999), was zu einem frühzeitigen Einstellen der Proliferation und zu einer vorzeitigen Differenzierung (Hypertrophie) führt. PTHrP wird von perichondralen Zellen und von Chondrozyten an den Enden der Knorpelanlage sekretiert. PTHrP wirkt parakrin über einen G-Protein gekoppelten PTH/PTHrP Rezeptor (PPR), welcher außerdem von dem verwandtem kalziumregulierenden Hormon Parathyrin (PTH) aktiviert wird (Juppner *et al.*, 1991; Abou-Samra *et al.*, 1992). Bindung von PTHrP an seinen Rezeptor führt zu einer Aktivierung des cAMP/Proteinkinase A- (PKA) und des Phospholipase C/Proteinkinase C- (PKC) Signalweges (Abou-Samra *et al.*, 1989; Iida-Klein *et al.*, 1989), über welche die Wirkung von PTHrP in der enchondralen Ossifikation vermittelt wird. PPR wird von proliferierenden Chondrozyten und von prä-hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Amizuka *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996).

PTHrP sorgt dafür, dass proliferierende Chondrozyten in Proliferation gehalten werden und hindert diese daran sich zu hypertrophen Chondrozyten zu differenzieren. PTHrP-*knockout* (PTHrP-/-) und PPR-*knockout* (PPR-/-) Mäuse sind letal und zeigen einen ähnlichen Phänotyp in Form von ausgeprägten Fehlbildungen des Skeletts. Beide weisen unter anderem einen kuppelförmigen Schädel und unverhältnismäßig kurze Extremitäten auf (Karaplis *et al.*, 1994; Lanske *et al.*, 1996). Diese Fehlbildungen sind jeweils auf eine Verminderung der Chondrozytenproliferation zusammen mit einer frühzeitigen terminalen Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten und verstärkten Verknöcherung zurückzuführen, was zu einer verfrühten enchondralen Ossifikation führt (Karaplis *et al.*, 1994; Lanske *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996). Wie durch diese Ergebnisse zu erwarten ist, führt die Expression einer konstitutiv aktiven Form des PPR in Chondrozyten von *Ihh*-/- Mäusen zu einer Umkehrung der frühen Hypertrophie in diesen Mäusen (Karp *et al.*, 2000). Die Fähigkeit von *Ihh*, die PTHrP Produktion zu aktivieren und damit die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten zu verzögern, wurde erstmals *in vitro* durch die Behandlung von Maus-Extremitätenexplantaten mit Sonic hedgehog Protein, als ein *Ihh* Ersatz, gezeigt (Vortkamp *et al.*, 1996). Die Behandlung führt zu einer Hemmung der hypertrophen Differenzierung in den murinen Chondrozyten von Wildtyp-Mäusen. Dieselbe Behandlung hatte aber keinen Effekt auf die terminale Differenzierung (Hypertrophie) von Chondrozyten in Explantaten von PTHrP-/- oder PPR-/- Mäusen. Diese Studien zeigen eindeutig, dass *Ihh* über eine Stimulierung der PTHrP-Expression das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten unterdrückt und einen Bereich von proliferierenden Chondrozyten aufrecht erhält.

Diese Interaktion zwischen *Ihh* und PTHrP führte zu der Hypothese, dass diese zwei parakrinen Faktoren das Maß der Chondrozytenproliferation und den Übergang von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten in einem negativen Feedbackmechanismus steuern (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). Außerdem stimmt *Ihh* die Ossifikation der Knochenmanschette mit diesen Prozesse aufeinander ab (Abbildung 5) (St-Jacques *et al.*, 1999).

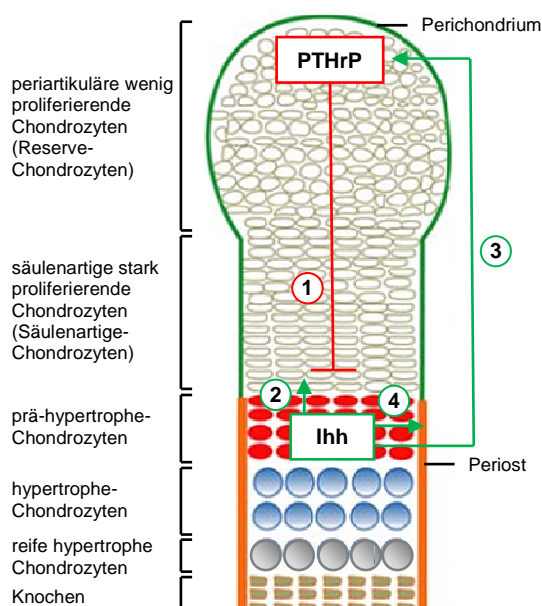


Abbildung 5: Der negative Feedbackmechanismus von Indian hedgehog und Parathyroid hormone-related protein in der embryonalen Wachstumsfuge. PTHrP wird von periartikulären Zellen sekretiert und wirkt proximal auf rezeptortragende proliferierende Chondrozyten. Es hält diese in Proliferation, hemmt deren hypertrophe Differenzierung und inhibiert ihre *Ihh*-Expression (1). Ist der Ausgangspunkt der PTHrP-Produktion genügend weit entfernt, kommt es zur hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten und zur Expression von *Ihh* durch postmitotische prä-hypertrophe Chondrozyten. *Ihh* wirkt über seinen Rezeptor auf Chondrozyten in unmittelbarer Nähe, um deren Proliferation zu erhöhen (2) und stimuliert die PTHrP Sekretion von perichondralen Zellen und Chondrozyten an den Enden der Epiphysen (3). *Ihh* induziert außerdem die Differenzierung von Osteoblasten in dem direkt an die prä-hypertrophen Chondrozyten angrenzenden Bereich des Perichondriums über den Ptc-1/Gli-Signalweg (4). Verändert nach Wuelling und Vortkamp, 2010.

PTHrP wird von periartikulären Zellen des Perichondriums und von Chondrozyten an den Enden der wachsenden Röhrenknochen (Reserve-Chondrozyten) exprimiert und sekretiert, von wo es durch Diffusion parakrin, auf die PTH/PTHrP Rezeptor tragenden mitotisch aktiven Chondrozyten der Proliferationszone wirkt (Amizuka *et al.*, 1996). PTHrP hemmt die Differenzierung der proliferierenden Chondrozyten zu postmitotischen hypertrophen Chondrozyten (Lee *et al.*, 1996), fördert deren Proliferation und hemmt die Expression von Ihh (Wallis, 1996; Kronenberg *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 1998). Chondrozyten außerhalb der Signalreichweite von PTHrP hören auf zu proliferieren, beginnen sich hypertroph zu differenzieren und Ihh zu exprimieren. Ihh kann dann, über einen noch nicht genau identifizierten Mechanismus, wiederum die Produktion von PTHrP an den Enden der Röhrenknochen stimulieren (Abbildung 5) (St-Jacques *et al.*, 1999). Neue Erkenntnisse über die Regulation der PTHrP-Expression durch Ihh konnten von Amano und Kollegen gewonnen werden. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass Gli2 direkt mit dem Transkriptionsfaktor Sox9 (siehe 1.3.4.1) assoziiert und gemeinsam die PTHrP-Promotoraktivität und PTHrP-Expression stimulieren (Amano *et al.*, 2009). Ihh fördert somit die Proliferation und hemmt die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten der Wachstumsfuge über die Aktivierung der PTHrP-Expression (Lanske *et al.*, 1996).

Zusammenfassend, ist Ihh ein Hauptregulator der terminalen Differenzierung von Chondrozyten und der Osteoblastendifferenzierung in der enchondralen Ossifikation. Ihh stimuliert die Proliferation von Chondrozyten direkt, aber auch indirekt über die Aktivierung der PTHrP Synthese. Die PTHrP Sekretion ermöglicht zum einen das Längenwachstum der Knochen indem Chondrozyten der Wachstumsfuge in der Proliferationsphase gehalten werden, und dient zum anderen als ein Inhibitor der hypertrophen Differenzierung. Durch die Ausbildung eines Konzentrationsgradientens bestimmt PTHrP die Entfernung von den Enden der Röhrenknochen, ab der die Chondrozyten aufhören zu proliferieren und beginnen sich hypertroph zu differenzieren. Dies ist ebenfalls die Stelle an der Ihh die Ausbildung der Knochenmanschette stimuliert. Es wird somit eine schrittweise terminale Differenzierung der Chondrozyten, beginnend in der Mitte der Knorpelanlage, ermöglicht, was die enchondrale Ossifikation initiiert (Abbildung 5).

TGF- β -Superfamilie

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, wie TGF- β s (Transforming growth factor- β), Activine und BMPs (Bone morphogenetic proteins), sind ebenfalls wichtige Signalmoleküle in der Regulation der enchondralen Ossifikation (Centrella *et al.*, 1994). Diese Wachstumsfaktoren binden und aktivieren bestimmte Kombinationen von Typ I und Typ II Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, was zur Ausbildung eines aktivierten heterodimeren Rezeptorkomplexes führt (Wrana *et al.*,

1992). Eine bestimmte Kombination von SMAD-Signalmolekülen werden vom Typ I Rezeptor über dessen aktivierte zytoplasmatische Serin/Threonin Kinase phosphoryliert, welche dann mit dem co-SMAD4 (collaborating) heterodimere SMAD-Komplexe bilden und in den Zellkern translozieren. Dort assoziieren die SMAD-Komplexe mit Transkriptionsfaktoren, was zu einem aktiven Transkriptionskomplex und zu einer Stimulierung der Zielgenexpression führt (Kretzschmar und Massague, 1998).

TGF- β bindet an den TGF- β Rezeptor Typ II was zur Rekrutierung und Transphosphorylierung des zytoplasmatischen Teils einer der zwei Typ I Rezeptoren (Typ I a und I b) führt (Lin *et al.*, 1992; Franzen *et al.*, 1993). Der Typ I Rezeptor phosphoryliert dann die Signalmoleküle SMAD2 oder -3, was zur Ausbildung von heterodimeren SMAD-Komplexen mit co-SMAD4 führt, welche in den Zellkern translozieren (Kretzschmar und Massague, 1998).

Die BMP vermittelte Signaltransduktion läuft auf ähnliche Weise ab. Hier werden die Serin/Threonin Kinasen der BMP Rezeptoren Typ I a oder b ebenfalls durch die Bindung an den BMP Rezeptor Typ II aktiviert. Hier kommt es jedoch zu einer Phosphorylierung der SMADs 1, -5 und -8 bevor es zu einer Interaktion mit co-SMAD4 kommt (Kretzschmar und Massague, 1998).

Mehrere *in vitro* Studien an Micromass Kulturen konnten zeigen, dass TGF- β 1 (Kulyk *et al.*, 1989a; Denker *et al.*, 1995), TGF- β 2 (Kulyk *et al.*, 1989a) und TGF- β 3 (Roark und Greer, 1994) die Chondrogenese fördern. In der enchondralen Ossifikation inhibiert TGF- β die Chondrozytenhypertrophie (Ballock *et al.*, 1993), was über eine Induktion der PTHrP-Expression gesteuert werden kann (Serra *et al.*, 1999).

Einzelne BMPs zeigen klare Expressionsmuster in der enchondrale Ossifikation. BMP2 wird in den Gebieten um das kondensierte Mesenchym (Lyons *et al.*, 1989; Duprez *et al.*, 1996a), zusammen mit BMP4 im Perichondrium (Lyons *et al.*, 1995; Duprez *et al.*, 1996a), sowie in geringen Mengen im Periost und der osteogenen Zone exprimiert (Lyons *et al.*, 1989). BMP5 wird zu Beginn der mesenchymalen Kondensation und im Perichondrium bzw. Periost exprimiert (King *et al.*, 1994). BMP6 (Lyons *et al.*, 1989) wird in hypertrophen Chondrozyten zusammen mit BMP2 exprimiert (Solloway *et al.*, 1998). Außerdem konnte eine hohe Expression von BMP7 im Perichondrium des sich entwickelnden Knorpels, aber nicht in den Bereichen der späteren Gelenksentstehung nachgewiesen werden (Macias *et al.*, 1997). Zusätzlich wird BMP7 in proliferierenden Chondrozyten exprimiert (Haaijman *et al.*, 2000).

Das bestimmte Expressionsmuster der einzelnen BMPs deutet auf eine spezifische Funktion der jeweiligen BMPs in der enchondralen Ossifikation. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass BMP2 mesenchymale Zellen um das anfängliche kondensierte Mesenchym herum rekrutiert und deren chondrogene Differenzierung fördert, während BMP4 perichondrale Zellen rekrutiert (Duprez *et al.*, 1996a). Desweiteren fördert die Behandlung von Micromass Kulturen mit BMP2 die Chondrogenese (Duprez *et al.*, 1996b). Mäuse mit einer Mutation im *BMP5*-Gen weisen

Fehlbildungen in der mesenchymalen Kondensation auf (Kingsley *et al.*, 1992). BMP6 spielt eine wichtige Rolle in der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten und in der Mineralisierung der Knorpelmatrix (Lyons *et al.*, 1989; Boskey *et al.*, 2002). BMP7 wird als Inhibitor der Gelenksentstehung beschrieben (Macias *et al.*, 1997). In der murinen mesenchymalen Zelllinie C3H10T1/2 induziert BMP7 zusammen mit BMP2 jedoch sowohl die Chondrozyten- als auch die Osteoblastendifferenzierung (Katagiri *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Asahina *et al.*, 1996). In multipotenten mesenchymalen Zellen, isoliert aus menschlichen Knochenmark, fördert BMP9 und BMP2 die Chondrogenese, was auf eine erhöhte Sox9-Expression zurückzuführen ist (Majumdar *et al.*, 2001).

In vivo Untersuchungen zur Rolle des BMP-Signalweges anhand von BMP Rezeptor I a und I b *knockout* Mäusen bestätigten dessen essenzielle Rolle in mannigfachen Aspekten der frühen Chondrogenese. Mäusen, denen entweder der Rezeptor I a oder der Rezeptor I b fehlt, bilden intakte Knorpelanlagen aus, die Rezeptoren sind folglich funktionell redundant. Doppel-*knockout*-Mäuse hingegen zeigen eine schwere generelle Chondrodysplasie. Der Großteil, der durch enchondrale Ossifikation entstehenden Knochen fehlen oder sind nur rudimentär ausgebildet (Yoon *et al.*, 2005). Die wenigen sich bildenden mesenchymalen Kondensationen in den Doppelmutanten werden im prä-chondrozytären Zustand aufgehalten und sind deutlich verkleinert, was auf eine erhöhte Apoptose und verringerte Proliferation der Zellen zurückzuführen ist. Des Weiteren ist die Expression der knorpelspezifischen Matrix deutlich reduziert, was auf ein Fehlen der Expression der Transkriptionsfaktoren Sox9, L-Sox5 und Sox6 im kondensierten Mesenchym zurückzuführen ist. Diese Studie zeigt, dass der BMP-Signalweg *in vivo* für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Chondrozyten von Nöten ist (Yoon *et al.*, 2005).

Auf zwei weitere sekretierte Proteine die Wnt und FGFs, die eine wichtige Rolle in der Chondrogenese spielen, soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Wnt-Familie

Die Wnt-Proteine sind eine Familie von 19 hoch konservierten und sekretierten Glykoproteinen, welche als Liganden für rezeptorgesteuerte Signalwege verschiedene Prozesse in der Entwicklung und im adulten Organismus spielen. Bei den Wnt-Proteinen handelt es sich um das Ortholog zum *wingless*-Gen in *Drosophila melanogaster* (Miller, 2002; Logan und Nusse, 2004). Der β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg ist ein Schlüsselregulator der chondrogenen Differenzierung. Wnt-Proteine binden an die G-Protein-gekoppelten sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren Frizzled (Frz), worüber verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden können (Angers und Moon, 2009). Die am besten verstandene Wnt-Signaltransduktionskaskade ist der β -Catenin-abhängige, kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg. In Abwesenheit von Wnt Liganden bildet sich ein Abbaukomplex bestehend aus

GSK3 (Glycogen synthase kinase 3), CK1 α (Casein kinase 1 α), Axin und APC (Adenomatous polyposis coli). Dieser Komplex phosphoryliert β -Catenin, was zu dessen Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau des Komplexes im Proteasom führt (Aberle *et al.*, 1997; Orford *et al.*, 1997). Die Bindung von Wnt-Liganden an die Frizzled Rezeptoren und den Wnt Co-Rezeptor LRP5 (Low density lipo protein receptor-related protein) oder LRP6 aktiviert das zytoplasmatische Phosphoprotein *Dishevelled*, welches den Abbaukomplex inhibiert und somit der Abbau von β -Catenin blockiert. β -Catenin reichert sich somit im Zytoplasma an und transloziert über die Bindung an Nukleoporine in den Zellkern (Fagotto *et al.*, 1998), wo es mit dem Transkriptionsfaktor LEF-1 (Lymphoid enhancer-binding factor) oder TCF (T cell factor) interagiert und die Gentranskription initiiert (Huber *et al.*, 1996; Korinek *et al.*, 1998). Die Frizzled Rezeptoren können von Wnt-Liganden auch in der Abwesenheit der Co-Rezeptoren LRP5 bzw. 6 aktiviert werden. Es kommt dabei zur Aktivierung von β -Catenin-unabhängigen, nicht kanonischen Signalwegen. Es ist bekannt, dass in Vertebraten die β -Catenin-unabhängige Wnt-Signaltransduktion den Wnt/ β -Catenin-Signalweg entgegenwirken kann (Torres *et al.*, 1996). Dieser Antagonismus ist physiologisch in der Regeneration von Geweben (Stoick-Cooper *et al.*, 2007) und der Entwicklung von Extremitäten wichtig (Topol *et al.*, 2003).

In der mesenchymalen Kondensation reguliert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Entwicklungsrichtung (Zellschicksal) von osteo-/chondrogenen Vorläuferzellen (Abbildung 2), hin zu Osteoblasten oder hin zu Chondrozyten (Hill *et al.*, 2005; Reinhold *et al.*, 2006). Große Mengen an β -Catenin führen zu einer osteogenen- und geringe Mengen zu einer chondrogenen Differenzierung (Day *et al.*, 2005). Dies wird über die Regulation von Sox9, einem wichtigen Förderer der Knorpelbildung gesteuert. β -Catenin hemmt die Sox9-Expression und damit die Knorpelbildung. Der Verlust der β -Catenin-Aktivität in mesenchymalen Zellen ist somit nötig, um die Chondrozytendifferenzierung zu aktivieren (Hill *et al.*, 2005). Die Interaktion von Sox9 und β -Catenin stimmt somit die Festlegung von Chondrozyten und Osteoblasten ab.

In differenzierten Chondrozyten fördert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die hypertrophe Differenzierung durch die Hemmung der PTHrP-Signaltransduktion (Guo *et al.*, 2009) und durch die Förderung der Runx2-Expression (siehe 1.3.4.2) (Dong *et al.*, 2006), sowie nachfolgend die enchondrale Ossifikation (Tamamura *et al.*, 2005). Sox9 kann diesen Signalweg durch die Phosphorylierung von β -Catenin, was dessen Degradation zur Folge hat, inhibieren (Topol *et al.*, 2009). Die Aktivierung des β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalweges z.B. durch Wnt5a spielt eine duale Rolle in der Chondrogenese. In der frühen Phase induziert Wnt5a die Chondrogenese und die Hypertrophie. Später kann Wnt5a die Hypertrophie über eine Inhibition der Runx2-Expression hemmen (Bradley und Drissi, 2010).

FGF-Familie

FGFs (Fibroblast growth factors) und deren Rezeptoren sind wichtige Regulatoren der Chondrozytenproliferation und -differenzierung. Sie hemmen die Chondrozytenproliferation und induzieren die hypertrophe Differenzierung und wirken somit der Wirkung von BMPs entgegen (Minina *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2006). Von den bis jetzt bekannten 22 *FGF*-Genen und 4 FGF-Rezeptoren (FGFR) sind viele FGFs auch in die Skelettentwicklung involviert, welche dort über die FGF Rezeptoren FGFR1, FGFR2, und FGFR3 wirken (Ornitz und Marie, 2002). Proliferierende Chondrozyten exprimieren FGFR3, prä-hypertrophe und hypertrophe Chondrozyten exprimieren FGFR1 und perichondrale Zellen FGFR2. In *Fgfr3-knockout* Mäusen ist die Proliferationsrate der Chondrozyten erhöht, was zu einer Vergrößerung des Säulenknorpelbereichs führt (Colvin *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996). Eine konstitutiv aktive Form des FGF Rezeptor 3 führt demnach zu einer Verminderung der Proliferation und zur Erhöhung der Apoptose in Chondrozyten (Sahni *et al.*, 1999). Bei Menschen führt eine Punktmutation im *FGFR3*-Gen zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor, was die Proliferation von Chondrozyten inhibiert und deren hypertrophe Differenzierung fördert, was zur Achondroplasie, einer Form des Minderwuchses führt (Yamaguchi und Rossant, 1995; Minina *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von FGFR3 in Chondrozyten intrazellulär über die Aktivierung des JAK–STAT1 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription-1) Signalweges vermittelt wird (Sahni *et al.*, 1999). Die dafür verantwortlichen Liganden sind noch nicht völlig charakterisiert. Das im Perichondrium exprimierte FGF18 wurde jedoch als Interaktionspartner von FGFR3 identifiziert. Das Ausschalten von FGF18 führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Proliferation, was dem beobachteten Effekt in *Fgfr3-knockout* Mäusen gleicht (Liu *et al.*, 2002; Ohbayashi *et al.*, 2002). Von *Fgf9* konnte bereits gezeigt werden, dass es die Hypertrophie von Chondrozyten fördert und die Vaskularisation der Wachstumsfuge reguliert (Hung *et al.*, 2007).

Die intrazellulären Signalwege, die von den eben beschriebenen Signalmolekülen ausgelöst werden, führen zur transkriptionellen Regulation von chondrozytenspezifischen Genen, welche die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und die enchondrale Ossifikation ermöglichen. Transkriptionsfaktoren spielen als Regulatoren der Genaktivität hierbei eine zentrale Rolle. Im nächsten Abschnitt soll auf die wichtigsten Transkriptionsfaktoren eingegangen werden, die an der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation beteiligt sind. Die Sox Familie von Transkriptionsfaktoren spielt dabei eine Schlüsselrolle, auf die folgend, auch im Bezug auf ihre Relevanz für diese Arbeit, genauer eingegangen wird.

Neben den hier beschriebenen Signalmolekülen sind noch weitere an der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation beteiligt, die hier aber nicht weiter erläutert werden.

1.3.4 Transkriptionsfaktoren

1.3.4.1 Die Sox-Familie von Transkriptionsfaktoren

Die Sox-Gene kodieren eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche viele entscheidende Funktionen in Entwicklungsprozessen, wie der Geschlechtsbestimmung, der Entstehung von Nervengewebe und der Skelettentwicklung spielen. Sie sind stark verwandt mit dem auf dem Y-Chromosom kodierten geschlechtsbestimmenden Faktor SRY (Sex determining region of chromosome Y), welcher zu der HMG (High-mobility group)-Box Superfamilie von DNA-Bindungsproteinen gehört (Laudet *et al.*, 1993). Die Sox Proteine besitzen ebenfalls diese DNA-Bindedomäne und gehören somit auch zur HMG-Box Superfamilie von Transkriptionsfaktoren. Sie werden aufgrund der Verwandtschaft zur HMG-Box von SRY als SRY-related HMG-box- (Sox) Gene bezeichnet.

Long-Sox5 (L-Sox5), Sox6 und Sox9 sind drei Mitglieder der Sox-Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine essenzielle Rolle in der Chondrogenese spielen. L-Sox5 und Sox6 gehören zur Subgruppe D der Sox-Familie von Transkriptionsfaktoren (Wegner, 1999). Sie sind insgesamt 67 % zueinander identisch und stimmen in ihrer C-terminal gelegenen HMG-Box-DNA-Bindedomäne und der N-terminal gelegenen coiled-coil-Domäne sogar zu mehr als 90% überein (Lefebvre *et al.*, 1998). Die Domäne vermittelt die Ausbildung von L-Sox5/Sox6-Protein Homo- und Heterodimeren (Lefebvre *et al.*, 1998). Sox9 gehört zur Subgruppe E (Wegner, 1999) der Sox-Familie von Transkriptionsfaktoren, dessen HMG-Box-Domäne nur zu 50 % mit der von L-Sox5 und Sox6 übereinstimmt. Auch außerhalb der HMG-Box-Domäne unterscheidet sich Sox9 grundlegend von L-Sox5 und Sox6. Sox9 besitzt im Vergleich zu L-Sox5 und Sox6 eine Transaktivierungsdomäne am C-Terminus (Sudbeck *et al.*, 1996; Lefebvre *et al.*, 2001). Somit ist Sox9 ein typischer Transkriptionsfaktor mit DNA-Binde- und Transkriptionsaktivierungsfunktionen.

Sox9

Der Transkriptionsfaktor Sox9 hat in der Chondrogenese eine entscheidende Rolle. In Menschen konnte das angeborene Skelettmissbildungssyndrom namens Campomele Dysplasie (CD) auf heterozygote Mutationen in und um das SOX9-Gen zurückgeführt werden (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1995). Bei männlichen CD Patienten tritt in 75 % der Fälle zusätzlich eine XY-Geschlechtsumkehr auf. Es kommt phänotypisch also zu Geburt eines Mädchens mit Ovar statt Testis, da SOX9 seine Rolle in der Geschlechtsbestimmung (Hodenentwicklung) nicht erfüllen kann (Mansour *et al.*, 1995). Patienten mit CD haben Fehlbildungen in den meisten Strukturen, die aus Knorpel entstehen, was durch gekrümmte und verkürzte Röhrenknochen, sowie Abnormalitäten der Schädel und Gesichtsknochen sichtbar wird (Hovmoller *et al.*, 1977; Houston *et al.*, 1983). Obwohl die Schwere der Symptome variabel

ist, sterben die Betroffenen in der Regel in den ersten Monaten aufgrund von Atemnot und nur wenige Patienten erreichen das Erwachsenenalter (Houston *et al.*, 1983). Heterozygote Sox9-*knockout* (Sox9+/-) Mäuse weisen fast vollständig die Skelettfehlbildungen der CD Patienten auf, was den Sachverhalt im Menschen bekräftigt (Bi *et al.*, 2001). Sie zeigen ebenfalls Fehlbildungen und eine Biegung der Knochen, die aus Knorpel entstehen. Außerdem konnte eine frühzeitige Reifung der proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsfuge zu hypertrophen Chondrozyten und eine verfrühte Mineralisierung der Matrix beobachtet werden (Bi *et al.*, 2001).

Sox+/- Mäuse sterben jedoch kurz nach der Geburt, was die Erzeugung einer homozygoten Sox9-*knockout*- (Sox9-/-) Maus ausschließt (Bi *et al.*, 2001). Um trotzdem den Effekt eines kompletten Verlustes von Sox9 auf die Chondrogenese *in vivo* untersuchen zu können, wurden Maus-Chimären generiert, indem homozygote embryonale Sox9-/- Stammzellen in Wildtyp-Blastozysten injiziert wurden (Bi *et al.*, 1999). Hier konnte gezeigt werden, dass die Sox9-/- Zellen keine mesenchymale Kondensation durchlaufen und keine der für Chondrozyten spezifischen Gene wie *Col2a1*, *Col9a2*, *Col11a2* und *Aggrecan* exprimieren (Bi *et al.*, 1999). Der Knorpel wurde hier immer von Wildtyp-Zellen generiert.

Um die Rolle von Sox9 in den einzelnen Schritten der Chondrogenese bzw. in der mesenchymalen Kondensation genauer untersuchen zu können, wurde das Cre/loxP-Rekombinations-System angewandt, um Sox9 selektiv in undifferenzierten mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen oder nach der chondrogenen mesenchymalen Kondensation auszuschalten (Akiyama *et al.*, 2002). Wird Sox9 bereits im Mesenchym der Extremitätenknospen vor der chondrogenen Kondensation ausgeschaltet kommt es weder zu einer Kondensation der Zellen noch zur Ausbildung von Knorpel oder Knochen (Akiyama *et al.*, 2002).

Die Studien von Bi und Akiyama und Kollegen zeigen (Bi *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002), dass Sox9 für die Initiation der Chondrogenese essenziell ist, indem es die mesenchymale Kondensation aktiviert. Dies wird von Expressionsstudien an Mausembryonen gestützt, die zeigen, dass Sox9 in der Chondrogenese von mesenchymalen Zellen bereits vor der mesenchymalen Kondensation exprimiert wird (Abbildung 6) (Wright *et al.*, 1995).

Während der Chondrogenese wird Sox9 auch nach der mesenchymalen Kondensation weiterhin in allen chondrogenen Vorläuferzellen während der Differenzierung zu Chondrozyten und in differenzierten proliferierenden Chondrozyten bis hin zu prä-hypertrophen Chondrozyten, aber nicht mehr in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Wright *et al.*, 1995; Ng *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997). Die Rolle von Sox9 in der Differenzierung zu Chondrozyten wurde als erstes in Expressionsstudien an Mausembryonen genauer untersucht. Es konnte hier eine eindeutige Koexpression von Sox9 und Kollagen Typ 2 (*Col2a1*), dem Hauptbestandteil der Knorpelmatrix,

in allen chondrogenen Vorläuferzellen und Chondrozyten festgestellt werden (Ng *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997). Sox9 bindet und aktiviert eine Konsensussequenz im Enhancer des *Col2a1*-Gens, welche für die chondrozytenspezifische Expression verantwortlich ist (Zhou *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997). Sox9 reguliert die Expression weiterer Bestandteile der Knorpel-EZM durch Bindung und Aktivierung der Enhancerelemente der jeweiligen Gene. Sox9 aktiviert neben *Col2a1* einen weiteren Hauptbestandteil der Knorpelmatrix; die Expression des Proteoglykans Aggrecan (Sekiya *et al.*, 2000). Sox9 ist auch für die Expression der weniger stark vertretenen Matrixproteine *Col9a2* (Zhang *et al.*, 2003), *Col11a2* (Bridgewater *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000) und CD-RAP (siehe 1.4) (Xie *et al.*, 1999) nötig. Diese Daten zeigen eine eindeutige Rolle von Sox9 in der Regulation von Chondrozyten spezifischen Genen nach der mesenchymalen Kondensation hin zur Differenzierung zu Chondrozyten (Abbildung 6).

Embryonen in denen die Sox9-Expression selektiv durch das oben genannte *Cre/loxP*-Rekombinations-System nach der mesenchymalen Kondensation ausgeschaltet wurde, zeigen eine schwere generalisierte Chondrodysplasie mit einer starken Verminderung der Produktion von knorpelspezifischen Matrixproteinen und dem Fehlen von proliferierenden Chondrozyten. Der Großteil der Zellen war als kondensierte mesenchymale Zellen arretiert und begannen nicht zu Chondrozyten zu differenzieren (Akiyama *et al.*, 2002). Das Ausschalten von Sox9 führte auch zu einer raschen Hypertrophie der Zellen, was darauf schließen lässt, dass Sox9 die Differenzierung von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten hemmt (Abbildung 6).

Somit spielt Sox9 auch nach der Initiation der Kondensation eine wichtige Rolle in der Chondrogenese. Sox9 ist für die Eröffnung der Chondrozytendifferenzierung über die Aktivierung von knorpelspezifischen Genen, sowie für den Erhalt der Chondrozytenproliferation nötig. Darüber hinaus hemmt Sox9 die terminale hypertrophe Differenzierung (Abbildung 6).

L-Sox5 und Sox6

L-Sox5 und Sox6 werden mit Sox9 während der gesamten Chondrogenese koexprimiert (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass L-Sox5 und Sox6 mit Sox9 zusammenarbeiten um die *Col2a1*- und Aggrecan-Expression zu aktivieren (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). Da das knorpelspezifische Enhancerelement des *Col2a1*-Gens dem des *Col11a2*-Gens stark ähnelt wird vermutet, dass auch die *Col11a2*-Expression kooperativ von Sox9, L-Sox5 und Sox6 aktiviert werden kann (Bridgewater *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001).

Die physiologische Rolle von L-Sox5 und Sox6 in der Chondrogenese wurde anhand von *knockout*-Mäusen untersucht. Sox5- und Sox6-*knockout* Mäuse sterben zwar früh nach der Geburt aufgrund von Atemnot, weisen aber nur relativ geringe Fehlbildungen des Skeletts auf. Diese betreffen Größe und Mineralisierung von nur wenigen Knochen, vor allem des

Brustkorbes (Smits *et al.*, 2001). Sox5/Sox6 doppel-*knockout*-Mäuse hingegen entwickeln schwere, generalisierte Chondrodysplasien mit praktisch keiner Ausbildung von echtem Knorpel und sterben an Herz- oder Kreislaufversagen an Tag 16,5 der Embryogenese (Smits *et al.*, 2001). In diesen doppel-*knockout*-Mäusen konnte eine normale mesenchymale Kondensation von chondrogenen Zellen an Tag 12,5 beobachtet werden. Der Großteil dieser Zellen war jedoch in dieser Phase arretiert und differenzierte nicht weiter zu Chondroblasten bzw. Chondrozyten. Die Expression der essenziellen Komponenten der Knorpel-EZM, wie Col2a1, Aggrecan, link Protein sowie Col9a2 und Col11a2 an Tag E14,5-E16,5 ist sehr gering oder nicht detektierbar (Smits *et al.*, 2001). Die Chondrozyten produzierten also nie die typische Knorpelmatrix, es kam auch zu keiner Ausbildung von Wachstumsfugen oder enchondralen Verknöcherungen. Letztendlich erlangen sie aber prä-hypertrophe und hypertrophe Zelleigenschaften, was Untersuchungen an Tag 16,5 ergaben. Die Menge an exprimierter Sox9-mRNA war jedoch mit der in Wildtyp-Knorpel vergleichbar. Zusammen mit *in vitro* Versuche in denen humane mesenchymale Stammzellen mit Sox9 behandelt wurden bestätigten, dass Sox9 die Expression von L-Sox5 und Sox6 induziert (Ikeda *et al.*, 2004).

L-Sox5 und Sox6 fördern somit nicht nur die Differenzierung von Chondroblasten, indem sie die Expression von knorpelspezifischen Genen aktivieren, sondern sind auch für wichtige Schritte der Chondrozytendifferenzierung der Wachstumsfuge essenziell. Sox5 und Sox6 halten Chondrozyten in Proliferation und hemmen die hypertrophe Differenzierung (Abbildung 6). Es gibt Hinweise, dass dies über eine Verminderung der Runx2-Expression vermittelt wird (Smits *et al.*, 2004).

Zusammenfassend erfüllen Sox9, L-Sox5 und Sox6 essenzielle Rollen in der Chondrogenese. Sox9 hat eine kritische Funktion in der frühen mesenchymalen Kondensation, in der Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten und in der Reifung von hypertrophen Chondrozyten. L-Sox5 und Sox6 liegen dabei *downstream* von Sox9, werden aber erst nach der mesenchymalen Kondensation induziert. L-Sox5 und Sox6 fördern in Zusammenarbeit mit Sox9 die schrittweise Reifung der Chondrozyten der Wachstumsfuge und sind damit essenziell für die Ausbildung des enchondralen Skeletts (Smits *et al.*, 2001). Allerdings ist keines der einzelnen Sox-Proteine alleine für die Differenzierung ausreichend, wie *in vitro* Experimente zeigten. Nur die Kombination aus Sox9, L-Sox5 und Sox6 konnte *in vitro* sowie *in vivo* die Differenzierung induzieren (Ikeda *et al.*, 2004). Dadurch liegt eine Rolle von Sox9, L-Sox5 und Sox6 als Hauptregulatoren der Chondrogenese nahe (Abbildung 6).

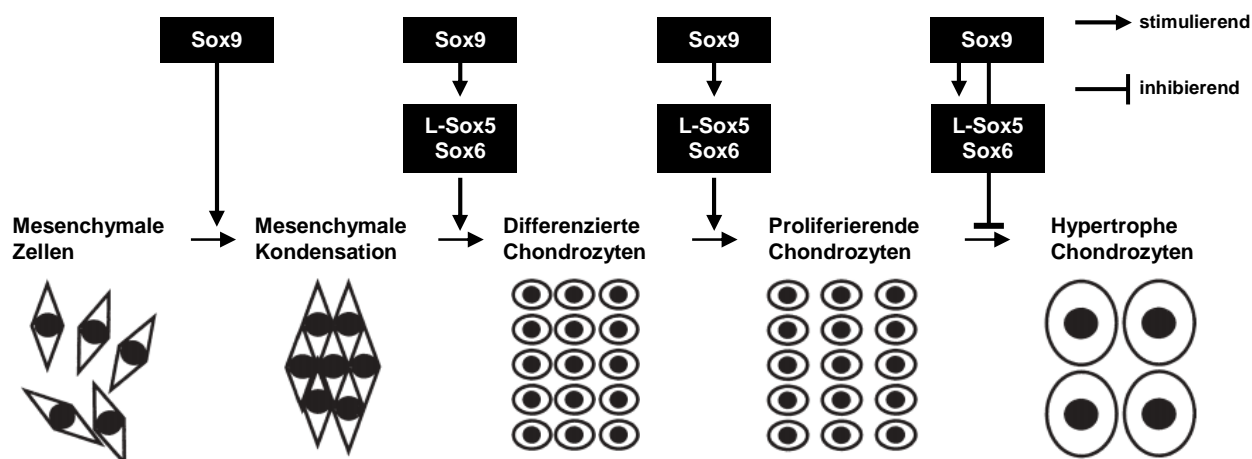


Abbildung 6: Die Rolle von Sox9, L-Sox5 und Sox6 in den aufeinanderfolgenden Schritten der Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation. Sox9 führt zur mesenchymalen Kondensation von undifferenzierten mesenchymalen Zellen und ist für die Differenzierung zu Chondrozyten, sowie den Erhalt der Chondrozytenproliferation essenziell. Die Differenzierung zu Chondrozyten sowie deren Proliferation wird in Zusammenarbeit mit L-Sox5 und Sox6 vermittelt, deren Expression ihrerseits von Sox9 aktiviert wird. Sox9 inhibiert die terminale Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten, ein Prozess der auch durch L-Sox5 und Sox6 unterstützt wird. Verändert nach Ikeda *et al.*, 2005.

1.3.4.2 Runx2

Der Transkriptionsfaktor Runx2 (Runt-related transcription factor 2) auch bekannt unter den Namen Pebp2a (Polyomavirus enhancer-binding protein 2 alpha), Osf2 (Osteoblast-specific factor 2), AML3 (Acute myeloid leukemia 3 protein) und Cbfa-1 (Core binding factor alpha 1) ist ein Ortholog des *Drosophila melanogaster* Runt Proteins (van Wijnen *et al.*, 2004). Zusätzlich zu dessen Rolle als Hauptregulator der Osteoblastendifferenzierung (Ducy *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Ducy *et al.*, 1999), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, ist Runx2 ein essenzieller Faktor in der Initiation der Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation. In Runx2-*knockout* (Runx2^{-/-}) Mäusen, welche kurz nach der Geburt an Atemnot sterben, bleibt das komplette Skelett knorpelig, da es zu keiner Ausreifung von Osteoblasten und zu keiner hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten kommt (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Inada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001). Umgekehrt führt eine Überexpression von Runx2 im Mesenchym des Kopfes von Hühnerembryonen zu einem Übermaß an Knochenbildung und an hypertrophen Chondrozyten (Eames *et al.*, 2004).

Runx2 wird in der späten Phase der mesenchymalen Kondensation der Chondrogenese exprimiert (Ducy *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Stricker *et al.*, 2002). In Chondroblasten und Chondrozyten nimmt die Expression stark ab, steigt aber wieder mit Beginn der hypertrophen Differenzierung in prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten (Kim *et al.*, 1999; Enomoto *et al.*, 2000; Stricker *et al.*, 2002). Runx2 wird ebenfalls stark in perichondralen Zellen und Osteoblasten exprimiert (Enomoto *et al.*, 2000).

Zusammen mit den verwandten Transkriptionsfaktoren Runx1 und Runx3, steuert Runx2 den vollständigen Ablauf der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten (Levanon *et al.*, 2001; Stricker *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005). Runx2 steuert die Transkription der folgenden Markergene der terminalen Differenzierung (Hypertrophie): *MMP-13* (Collagenase-3) (Jimenez *et al.*, 1999), *Col10a1* (Kollagen Typ X) (Enomoto *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003; Higashikawa *et al.*, 2009), *Ihh* (Yoshida *et al.*, 2004) und *VEGF* (Kwon *et al.*, 2011).

Wie bereits unter Abschnitt 1.3.3 beschrieben, stimuliert *Ihh* die Proliferation von Chondrozyten und hemmt deren Reifung von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten über die Stimulation der PTHrP-Expression (St-Jacques *et al.*, 1999). Runx2 ist somit ein Teil des negativen *Ihh*/PTHrP Feedbackmechanismus und reguliert auf diese Weise das Längenwachstum von Röhrenknochen (Yoshida *et al.*, 2004). Runx2 reguliert des Weiteren die Expression von VEGF (Vascular endothelial growth factor) in den hypertrophen Chondrozyten (Zelzer *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2011), welcher für das Einwachsen von Kapillargefäßen (Vaskularisation) in die mineralisierte Knorpelmatrix benötigt wird (Gerber *et al.*, 1999; Haigh *et al.*, 2000). Schaltet man die VEGF-Expression in Chondrozyten von Mäusen spezifisch aus, verzögert sich die Vaskularisation und die Ossifikation der primären Ossifikationszentren (Zelzer *et al.*, 2004).

1.3.4.3 Tfp2

Drei Mitglieder der Tfp2 (Transcription factor Ap-2) Familie von Transkriptionsfaktoren: Ap-2 α (Williams *et al.*, 1988), Ap-2 β (Moser *et al.*, 1995) und Ap-2 ϵ (Wang *et al.*, 2004) sind ebenfalls an der Knorpelentwicklung beteiligt.

Erste Hinweise auf die Rolle des Transkriptionsfaktors Ap-2 α in der Skelettentwicklung zeigten sich an Untersuchungen der Ap-2 α -*knockout*-Maus. Diese sterben kurz nach der Geburt mit einer Thorako-Gastroschisis (Fissur der Bauchwand), sowie starken Fehlbildungen des Gesichtes, des Schädels, der Sinnesorgane und der Hirnnerven. Die Mäuse weisen zudem ein offenes Neuralrohr und Fehlbildungen des Skeletts im Kopf und Rumpfbereich auf, wo viele Knochen deformiert sind oder fehlen (Schorle *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Es wurde eine Ap-2 α -Expression in der Neuralleiste, dem peripheren Nervensystem, dem Mesenchym des Gesichtes, den Extremitäten und embryonalen Epithelien nachgewiesen (Moser *et al.*, 1997). *In vivo* Analysen zeigten eine Ap-2 α -Proteinexpression in den Chondrozyten des Gelenks- und Meniskusknorpels. In der Wachstumsfuge konnte eine schwache zytoplasmatische Expression in proliferierenden Chondrozyten gezeigt werden. Mit zunehmender Hypertrophie steigt die Proteinexpression und die Kernlokalisierung (Davies *et al.*, 2002). *In vitro* Studien ergaben eine biphasische Regulation der Expression der Chondrozytenmarkergene *CD-RAP* (siehe 1.4) und *Col2a1* durch Ap-2 α . Hohe Konzentrationen führen zu einer Hemmung der *CD-RAP* bzw.

Col2a1-Promotoraktivität und niedrige Konzentrationen aktivieren diese (Xie *et al.*, 1998; Purple *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse stimmen mit immunhistochemischen Untersuchungen der Wachstumsfugen von Mäusen überein. Hier konnte eine hohe CD-RAP und *Col2a1* Proteinexpression in proliferierenden Chondrozyten zusammen mit einer niedrigen Ap-2 α -Expression, bzw. eine niedrige CD-RAP- und *Col2a1*-Proteinexpression zusammen mit einer hohen Ap-2 α -Expression in hypertrophen Chondrozyten bestätigt werden (Davies *et al.*, 2002). In der murinen chondrogenen Vorläuferzelllinie ATDC5 wurde Ap-2 α als ein Inhibitor der Chondrozytendifferenzierung identifiziert. Während der Differenzierung von ATDC5 Zellen nimmt die Ap-2 α -mRNA-Expression mit zunehmender Differenzierung stetig ab (Huang *et al.*, 2004). Die Überexpression von Ap-2 α hält die Zellen in ihrem prä-chondrozytären Zustand und inhibiert deren Differenzierung, was durch eine Inhibition der *Col2a1*-, Aggrecan- und *Col10a1*-mRNA-Expression durch Ap-2 α bestätigt wurde. Untersuchungen der Hauptregulatoren in der Initiation der Chondrogenese zeigten eine Inhibition der L-Sox5- und Sox6-Expression, aber eine Stabilisierung der Sox9-Expression durch Überexpression von Ap-2 α (Huang *et al.*, 2004). Die Expression des Transkriptionsfaktors Ap-2 β konnte ebenfalls in den Extremitätenknospen von Mausembryonen nachgewiesen werden. Er wird dort in der Zone polarisierender Aktivität exprimiert, ein Bereich am Hinterrand (posterior) der Extremitätenknospe, von dem Signale für die korrekte Entwicklung der Extremität ausgehen (Rock *et al.*, 2007).

Ap-2 ϵ wurde im sich entwickelnden *Bulbus olfactorius* (Feng und Williams, 2003), im Mesencephalon, im Metencephalon (Wang *et al.*, 2004) sowie in hypertrophen Chondrozyten der enchondralen Ossifikation (Wenke *et al.*, 2006) nachgewiesen. Es konnte darüber hinaus eine Expression im Gelenksknorpel gezeigt werden. Hier reguliert Ap-2 ϵ die Integrin alpha 10-Expression in Chondrozyten biphasisch (Wenke *et al.*, 2006). Eine *in vitro* Promotorstudie zeigte eine Interaktion von Sox9 mit dem Ap-2 ϵ -Promotor, was zu dessen Aktivierung führte (Wenke *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte eine erhöhte Ap-2 ϵ -Expression im Gelenksknorpel von Osteoarthrosepatienten nachgewiesen werden (Wenke *et al.*, 2009). Ap-2 ϵ aktiviert und bindet seinerseits den Promotor des *CXCL1*-Gens (Wenke *et al.*, 2011), ein Chemokin welches im Knorpel von Osteoarthrosepatienten überexprimiert ist (Borzi *et al.*, 1999). Eine aktuelle Studie zeigte die transkriptionelle Inhibition des *Col2a1*-Promotors durch Ap-2 ϵ , woran aber ein weiterer, bisweilen unbekannter Faktor beteiligt zu sein scheint (Niebler und Bosserhoff, 2013).

Abbildung 7 soll einen Überblick über den Verlauf der Chondrogenese sowie der enchondralen Ossifikation mit den daran beteiligten Transkriptionsfaktoren und die dadurch exprimierten Genprodukte geben. Es wurden nur hier beschriebene Faktoren abgebildet.






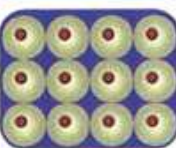

Differenzierungsstufe	Histologie	EZM - Marker	Regulatorische Marker
mesenchymale Zellen - chondrogene Vorläuferzellen		Kollagen Typ I, Fibronectin (N-Cadherin, N-CAM, Tanescin-C)	Sox9, Runx2
kondensierte mesenchymale Zellen - Chondroblasten		N-Cadherin, N-CAM, Tanescin-C, Kollagen Typ I, Fibronectin (Kollagen Typ II)	Sox9 (L-Sox5, Sox6)
reife Chondrozyten		Kollagen Typ II, IX und XI, Aggrecan, CD-RAP, Link Protein, Fibronectin	Sox9, L-Sox5, Sox6
proliferierende Chondrozyten		Kollagen Typ II, IX und XI, Aggrecan, CD-RAP, Link Protein, Fibronectin	Sox9, L-Sox5, Sox6
prä-hypertrophe Chondrozyten		Kollagen Typ II, IX und XI, Aggrecan, CD-RAP, Link Protein, Fibronectin (Kollagen Typ X)	Sox9, L-Sox5, Sox6 (Runx2, Runx1 und Runx3)
hypertrophe Chondrozyten		Kollagen Typ X, Matrix metalloproteinase-13	Runx2, Runx1 und Runx3, (Vegf)
reife hypertrophe Chondrozyten		Kollagen Typ X, Matrix metalloproteinase-13	Runx2, Vegf

Abbildung 7: Anschauliche Darstellung der einzelnen Abschnitte der Chondrozytendifferenzierung. Aufgeführt sind die histologische Erscheinung, die wichtigsten Proteine der Extrazellulären Matrix und die charakteristischen Transkriptionsfaktoren, der jeweiligen Differenzierungsstufe. Es handelt sich bei der Expression der Proteine um einen fließenden Vorgang, der nicht immer scharf abgegrenzt werden kann. In Klammern sind daher beginnende Prozesse kenntlich gemacht. Verändert nach Lefebvre und Smits, 2005.

1.4 MIA/CD-RAP

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle des Protein MIA/CD-RAP in der Chondrogenese untersucht. Allgemeine Erkenntnisse über das Protein, sowie die bisher bekannten Funktionen im Knorpel werden im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

1.4.1 Die MIA-Proteinfamilie

Das Protein MIA (Melanoma inhibitory activity) ist ein sekretiertes Protein, welches erstmals in Zellkultur-Überständen der humanen Melanomzelllinie HTZ-19dM entdeckt wurde (siehe 1.4.3) (Bogdahn *et al.*, 1989). MIA wird in normaler Haut bzw. normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) nicht exprimiert. In den meisten benignen Nävi konnte eine geringe Expression nachgewiesen werden. Diese ist aber in Melanomzellen um ein Vielfaches verstärkt (van Groningen *et al.*, 1995; Bosserhoff *et al.*, 1996; Bosserhoff *et al.*, 1999b; Perez *et al.*, 2000). Eine erhöhte MIA-Expression konnte auch im Chondrosarkom (Bosserhoff *et al.*, 1997b),

dem Mammakarzinom (Bosserhoff *et al.*, 1999b) und dem Pankreaskarzinom (El Fitori *et al.*, 2005) bestätigt werden. Im gesunden Gewebe wird MIA im Knorpel, wo es als CD-RAP (Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein) in bovinen Chondrozyten identifiziert, wurde exprimiert (Dietz und Sandell, 1996). Eine Expression von MIA konnte ebenfalls in sich entwickelnden Brustdrüsen gezeigt werden, was auf eine Rolle in der Organogenese schließen lässt (Xie *et al.*, 2000).

Zur MIA-Proteinfamilie gehören noch die homologen Proteine OTOR (FDP, MIAL) (Robertson *et al.*, 2000), MIA2 (Bosserhoff *et al.*, 2003a) und TANGO (MIA3) (Bosserhoff *et al.*, 2004). OTOR wird während der Entwicklung des Innenohrs exprimiert (Cohen-Salmon *et al.*, 2000; Rendtorff *et al.*, 2001). MIA2 wird in den Hepatozyten der Leber exprimiert (Hellerbrand *et al.*, 2005), wo es als Tumorsuppressor im hepatozellulären Karzinom dient (Hellerbrand *et al.*, 2008). Bei TANGO handelt es sich um ein ubiquitäres Protein, das in den meisten Geweben mit Ausnahme des Knochenmarks und den mononukleäre Zellen des peripheren Blutes exprimiert wird (Bosserhoff *et al.*, 2004). Es konnte eine Funktion als Tumorsuppressor im hepatozellulären Karzinom, im Kolonkarzinom (Arndt und Bosserhoff, 2007) und im malignen Melanom (Arndt und Bosserhoff, 2006) gezeigt werden.

1.4.2 Proteinstruktur

MIA ist ein kleines globuläres Protein von etwa 11kDa, das als Vorläufer-Protein mit 131 Aminosäuren (AS) translatiert wird und nach Abspaltung eines 24 AS langen hydrophoben Signalpeptides als reifes Protein von 107 AS in den Extrazellularraum sezerniert wird. NMR (Nuclear magnetic resonance) Analysen zeigten, dass MIA eine SH3 (Scr-homology 3) ähnliche Domäne mit zwei zusätzlichen Disulfidbrücken zur Stabilisierung besitzt (Lougheed *et al.*, 2001; Stoll *et al.*, 2001). Über diese Domäne kann eine Bindung an Prolin-reiche Peptid-Sequenzen vermittelt werden. Dieses Strukturmotiv wird häufig bei Proteinen gefunden, die an intrazellulären Signalweiterleitungen beteiligt sind, da damit Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden (Musacchio *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994). MIA ist jedoch das erste extrazelluläre Protein, das diese Motiv besitzt (Stoll *et al.*, 2001). Es konnte eine direkte Interaktion von MIA mit den extrazellulären Matrixproteinen Fibronectin (Stoll *et al.*, 2001), Tenascin und Laminin (Bosserhoff *et al.*, 2003b) nachgewiesen werden. MIA bindet und maskiert dabei spezifische Epitope dieser Matrixproteine, die für die Bindung an Zelloberflächenmoleküle (Integrine) verantwortlich sind (Bosserhoff *et al.*, 2003b). Außerdem konnte eine spezifische Bindung von MIA an Integrin alpha 4 beta 1 und alpha 5 beta 1 nachgewiesen werden, was zu einer Inhibition der Integrinaktivität führt (Bauer *et al.*, 2006). Zusammenfassend sind alle Mitglieder der MIA-Proteinfamilie sezernierte Proteine und besitzen eine SH3-Domäne für spezifische Proteininteraktionen (Bosserhoff *et al.*, 2004).

1.4.3 MIA im malignen Melanom

Melanomzellen aus Primärtumoren und Metastasen exprimieren und sezernieren große Mengen an MIA, wobei diese in gesunder Haut nicht nachweisbar ist. Dies wurde durch eine erhöhte Proteinmenge im Serum von Melanompatienten unterstrichen. Da die Höhe des Serumspiegels mit dem Fortschreiten der Erkrankung (Progression) korreliert, konnte das Protein MIA als diagnostischer Marker etabliert werden (Bosserhoff *et al.*, 1997a; Bosserhoff *et al.*, 1999a; Stahlecker *et al.*, 2000; Bosserhoff *et al.*, 2001a). Aufgrund von *in vitro* Experimenten wurde zunächst von einer proliferationsinhibierenden Wirkung des Proteins auf Melanomzellen ausgegangen, was ihm den Namen *Melanoma inhibitory activity* gab (Bogdahn *et al.*, 1989; Blesch *et al.*, 1994). Später zeigte sich jedoch, dass diese Wirkung nicht auf eine tumorsuppressive Funktion, sondern auf ein vermindertes Anhaften der Zellen an Bestandteile der EZM zurückzuführen ist. *In vitro* wird somit ebenfalls die Zellanhaftung an die Oberfläche der Zellkulturgefäße und damit auch das Zellwachstum durch MIA verhindert, was den Schein einer wachstumshemmenden Wirkung erzeugte. Es konnte gezeigt werden, dass die oben beschriebene Bindung von MIA an Integrine und Komponenten der EZM für das Loslösen der Melanomzellen aus der EZM verantwortlich ist. Die Interaktion der Zellen über Integrine mit der EZM wird verhindert und es kommt so zu einem aktiven Loslösen der Melanomzellen aus dem Tumorverband (Bosserhoff *et al.*, 2003b; Bauer *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2010). Über diesen Mechanismus fördert MIA die Metastasierung und Progression des malignen Melanoms (Guba *et al.*, 2000; Bosserhoff *et al.*, 2001b).

In vitro Studien zeigten des Weiteren, dass MIA an der Entstehung eines malignen Zelltyps beteiligt ist. Das stabile Ausschalten der MIA-Expression per *antisense*-Technologie in der humanen Melanomzelllinie HMB2 führte zur Wiederherstellung eines melanozytären Phänotyps (Poser *et al.*, 2004). Es kommt zu einer charakteristischen Veränderung der Zellmorphologie und zu einer Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten. MIA-defiziente Melanomzellen zeigen eine Reinduktion der Melaninsynthese und weisen mehr dendritische Zellausläufer auf. Sie exprimieren verstärkt E-Cadherin und vermindern die Expression von N-Cadherin. Es kommt darüber hinaus zu einer Abnahme der Expression von verschiedenen Melanom-assoziierten Genen (Poser *et al.*, 2004; Tatzel *et al.*, 2005).

Es wurde außerdem eine Regulation von intrazellulären Signalwegen beschrieben. Durch die Interaktion von MIA mit Integrin alpha 4 beta 1 und alpha 5 beta 1 kommt es zu einer Hemmung der Integrinaktivität und damit zu einer Hemmung des MAPK-Signalweges über die Inhibition der ERK (Extracellular-signal Regulated Kinases) Aktivität (Bauer *et al.*, 2006).

1.4.4 MIA/CD-RAP im Knorpel

Expressionsstudien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnten zeigen, dass MIA/CD-RAP *in vivo* und *in vitro* von Chondrozyten exprimiert wird (Dietz und Sandell, 1996). Genauere Analysen der MIA/CD-RAP-Expression in der Chondrogenese, per *in situ* Hybridisierung als auch per Immunhistochemie, ergaben eine Beschränkung der Expression auf Knorpelgewebe. Es besteht dabei eine enge Korrelation der MIA/CD-RAP-Expression mit dem Beginn der Differenzierung von Chondroblasten, welche während der kompletten Entwicklung vorhanden bleibt (Dietz und Sandell, 1996; Bosserhoff *et al.*, 1997b). Die MIA/CD-RAP-Expression korreliert dabei eng mit der Expression des chondrozytären Differenzierungsmarkers Kollagen Typ II (Dietz und Sandell, 1996). Es konnte außerdem eine Korrelation mit der Aggrecan-Expression sowohl in der frühen und mittleren Phase der Differenzierung von humanen primären Chondrozyten als auch in der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden (Onoue *et al.*, 2011). In einem Frakturheilungsmodell an Mäusen wurde die MIA/CD-RAP-Proteinexpression im Knorpel des heilenden Knochens ebenfalls bestätigt. MIA/CD-RAP wird darum als möglicher molekularer Marker für die Knorpelbildung in der Frakturheilung gesehen (Sakano *et al.*, 1999). *In vivo* Untersuchungen an transgenen Mäusen in denen ein *lacZ* Reportergen unter die Kontrolle des *MIA/CD-RAP*-Promotors gestellt wurde, zeigten eine eindeutige Expression des Reportergens in sich entwickelnden Knorpel der Chondrogenese, sowie in adulten Knorpel (Xie *et al.*, 2000). *In vitro* Untersuchungen an primären Chondrozyten belegen, dass die MIA/CD-RAP-Expression beginnt, sobald die Differenzierung in dedifferenzierten Chondrozyten einsetzt. MIA/CD-RAP konnte somit als spezifischer Marker für die Chondrozytendifferenzierung identifiziert werden (Bosserhoff und Buettner, 2003) und zusammen mit den vorhergehenden Ergebnissen eine eindeutige Rolle in der Chondrogenese zugewiesen werden.

Die Bestimmung der MIA/CD-RAP Proteinkonzentration in Körperflüssigkeiten *in vivo* zeigte erhöhte MIA/CD-RAP Serumkonzentrationen von Patienten mit Gelenksschädigung assoziierter rheumatoider Arthritis (Muller-Ladner *et al.*, 1999). Dieselben Beobachtungen konnten nach starker Belastung des Gelenkknorpels, wie nach Marathonläufen bzw. extremen Trainings gemacht werden (Neidhart *et al.*, 2000). Daher wird MIA/CD-RAP als ein Marker für Gelenksschädigungen in Sport und Krankheit gehandelt. In *in vitro* Experimenten konnte der Nachweis von MIA/CD-RAP im Zellkulturüberstand auch zur Kontrolle der chondrozytären Differenzierung eingesetzt werden (Bosserhoff und Buettner, 2003).

In vivo Untersuchungen der MIA-*knockout*-Maus ergaben ultrastrukturelle Störungen in der Organisation der Knorpelmatrix. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten deutliche Unterschiede in der Kollagenfaserdichte, im Durchmesser und in der Anordnung im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Diese Ergebnisse zeigen, dass MIA/CD-RAP für die exakte Ausbildung der stark geordneten Ultrastruktur der Knorpelmatrix wichtig ist und unterstreichen dessen Rolle in

der Interaktion von Matrixmolekülen (siehe 1.4.2). Die MIA-*knockout*-Maus ist aber lebensfähig und entwickelt sich normal (Moser *et al.*, 2002).

Untersuchungen zur Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese *in vitro* konnten zeigen, dass MIA/CD-RAP alleine nicht in der Lage ist die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu induzieren. Zusammen mit BMP2 oder TGF- β 3 fördert MIA/CD-RAP jedoch die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und hemmt die Differenzierung zu Osteoblasten, im Vergleich zu einer Behandlung mit BMP2 oder TGF- β 3 alleine. In primären Chondrozyten fördert MIA/CD-RAP die Ablagerung von EZM, was zur Erhöhung des Glykosaminoglykangehaltes führt (Tscheudschilsuren *et al.*, 2006). Wie bereits im Melanom gezeigt, kann MIA eine Integrin-vermittelte ERK-Inhibition auslösen (Bauer *et al.*, 2006). Auch in Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP die Aktivität von Integrin alpha 5 durch direkte Bindung aufhebt und somit zur Inhibition des MAPK/ERK-Signalweges führt (Schubert *et al.*, 2010). Im Knorpel ist bekannt, dass eine negative Regulation dieses Signalweges die Chondrozytendifferenzierung unterstützt (Forsyth *et al.*, 2002). Diese Wirkung konnte *in vitro* bestätigt werden, da eine Behandlung von Chondrozyten mit MIA/CD-RAP oder spezifischen ERK-Inhibitoren zu einer Induktion der Aggrecan-Expression führt (Schubert *et al.*, 2010). Dies zeigt erste Funktionen von MIA/CD-RAP in der Regulation von Signalwegen in der chondrogenen Differenzierung, was zu einer Förderung der chondrogenen und zu einer Hemmung der osteogenen Differenzierung führt.

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf die Bedeutung von MIA/CD-RAP im adulten Knorpel und auf dessen Rolle als Regulator der Chondrogenese. Die molekulare Funktion von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese ist jedoch weiterhin unklar und wird in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

2. Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum molekularen Verständnis der Entwicklung von Knorpel (Chondrogenese) beim Menschen beizutragen. Die Untersuchung der Rolle des Proteins MIA/CD-RAP in diesem Prozess stand dabei im Vordergrund. MIA/CD-RAP wird gleichfalls von Melanomzellen und von Chondrozyten exprimiert und sezerniert. Obwohl MIA/CD-RAP in der Chondrogenese von Beginn an exprimiert wird und auch im adulten Knorpel nachgewiesen werden kann, blieb dessen Funktion in der Knorpelentwicklung bis jetzt jedoch weitgehend ungeklärt. Die Arbeit lässt sich diesbezüglich in folgende drei Teile untergliedern:

1) In zwei *in vivo* Modellen zur Untersuchung von Knorpelstabilität und Knorpelbildung konnte eine erhöhte Knorpelregeneration in MIA-*knockout* Mäusen festgestellt werden. Die molekulare Ursache dieser Beobachtungen sollte im ersten Abschnitt dieser Arbeit geklärt werden und mögliche Schlüsse für die Rolle von MIA/CD-RAP im adulten Knorpel sowie in der Knorpelentwicklung gezogen werden. In diesem Zusammenhang sollte auf die Rolle des Proteins NONO (p54^{nrb}) eingegangen werden, welchem kürzlich eine Funktion in der Chondrogenese zugeordnet werden konnte und im Melanom als MIA/CD-RAP reguliertes Protein identifiziert wurde.

2) Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte geklärt werden, auf welche Weise MIA/CD-RAP das Protein p54^{nrb} reguliert und es sollten mögliche Mediatoren für diese Regulation aufgedeckt werden.

3) Obgleich die MIA/CD-RAP-Expression mit der Chondrogenese korreliert, sind MIA-*knockout* Mäuse lebensfähig, entwickeln sich normal und zeigen neben ultrastrukturellen Veränderungen der Knorpelmatrix keine Missbildungen. Es sollte aus diesem Grund im letzten Abschnitt dieser Arbeit auf die Chondrogenese *in vivo* in MIA-*knockout*-Embryonen eingegangen werden. Molekulare Veränderungen während der Embryogenese sowie mögliche redundante Mechanismus, welche den annähernd normalen Phänotyp trotz des MIA/CD-RAP-Verlustes erklären, sollten konkretisiert werden.

3. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Daten, konnten bereits publiziert oder zur Veröffentlichung eingereicht werden (siehe „Eigene Publikationen“ Seite 148). Die Abbildungen in dieser Dissertation entsprechen denen in den Veröffentlichungen oder denen zur Veröffentlichung eingereichten, und sind daher mit englischer Beschriftung. Die entsprechenden Veröffentlichungen sind in der Abbildungsbeschriftung genannt.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpelaufbau sowie in der Knorpeldifferenzierung. Hierzu wurden unterschiedliche *in vivo* und *in vitro* Modelle unter Verwendung der MIA-*knockout*-Maus angewandt. Das von MIA/CD-RAP regulierte Protein NONO (p54^{nrb}) wurde dabei als Vermittler der Effekte von MIA/CD-RAP im Knorpel identifiziert (Abschnitt 3.1) (**Schmid et al., 2010**).

In zwei weiteren Publikationen wurde die Regulation der p54^{nrb}-Expression durch MIA/CD-RAP auf transkriptioneller Ebene analysiert. Der p54^{nrb}-Promotor wurde hierfür charakterisiert und dessen Regulation durch MIA/CD-RAP im Melanom bestätigt. Diese Daten wurden in gleichberechtigter Kooperation mit Nicole Zimara und Dr. Susanne Schiffner (jeweils Abteilung für Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) veröffentlicht (**Schiffner et al., 2011**). Des Weiteren wurde der Transkriptionsfaktor identifiziert, welcher die MIA/CD-RAP vermittelte Aktivierung der p54^{nrb}-Transkription steuert (Abschnitt 3.2) (**Schmid et al., 2013 und Schmid et al.** zur Veröffentlichung eingereicht).

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von MIA/CD-RAP in der Knorpelentwicklung *in vivo* anhand von *in situ* Hybridisierungen an verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien von MIA-*knockout*-Mäusen untersucht. Ergänzend wurden dazu *in vitro* Studien an mesenchymalen Stammzellen durchgeführt (Abschnitt 3.3) (**Schmid und Bosserhoff** zur Veröffentlichung eingereicht).

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse ausführlich dargestellt.

3.1 *In vivo* (adult) und *in vitro* Untersuchungen zur Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel

Aus *in situ* Hybridisierungen an Mausembryonen ist bereits bekannt, dass MIA/CD-RAP schon am Anfang der Chondrogenese exprimiert wird (Dietz und Sandell, 1996) und dessen Expression während der kompletten Knorpelentwicklung vorhanden bleibt (Bosserhoff et al., 1997b). Dies macht MIA/CD-RAP zu einem spezifischen Marker der chondrozytären

Differenzierung (Bosserhoff und Buettner, 2003) und weist auf eine Funktion in der Knorpelentwicklung hin.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte nun die molekulare Funktion von MIA/CD-RAP in der Knorpeldifferenzierung untersucht werden. MIA-*knockout*- (MIA^{-/-}) Mäuse entwickeln sich normal und selbst durch lichtmikroskopische Untersuchungen sind keine Missbildungen festzustellen (Moser *et al.*, 2002). Darum wurden zunächst zwei *in vivo* Modelle zur Untersuchung der Knorpelbildung, -Regeneration und -Differenzierung an MIA^{-/-} Mäusen angewandt. Es handelte sich dabei um ein Frakturheilungsmodell und ein Modell für die Induktion von Osteoarthritis, da ein Phänotyp manchmal erst unter pathologischen Bedingungen, d.h. Belastung des zu untersuchenden Systems, auftritt. Das Osteoarthritismodell wurde von Herrn Dr. Thomas Schubert (Abteilung für Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) und das Frakturheilungsmodell von Herrn Dr. Alfred Opolka (Abteilung für Orthopädie, Universität Regensburg) durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) wurden zum Teil von Simone Kaufmann (Abteilung für Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) angefertigt. Die molekulare Analyse war anschließend Bestandteil meiner Arbeit.

3.1.1 Die Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel unter pathologischen Bedingungen

Zur Untersuchung der chondrozytären Differenzierung in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP wurde zunächst ein Modell zur Induktion von Osteoarthritis (OA) an sechs Wochen alten Wildtyp- (WT) und MIA^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Osteoarthritis wurde durch eine Ablösung des *Meniscus medialis* vom Tibiaplateau, wodurch es zu einer Instabilisierung des Kniegelenkes kommt, ausgelöst. Der Fortschritt der OA wurde nach 10, 21 und 42 Tagen in einem *Grade mal Stage* Verfahren nach Pritzker (Pritzker *et al.*, 2006) analysiert. Hierzu wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen an histologischen Schnitten des Kniegelenkes angefertigt. Interessanterweise war die Schwere der Osteoarthritis in MIA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen 21 und 42 Tage nach dem Start des Modells signifikant reduziert. Im Allgemeinen entwickelten MIA^{-/-} Mäuse jedoch OA, welche sich von Tag 10 nach Tag 21 verschlimmerte, sich nach 42 Tagen aber wieder deutlich besserte, was auf eine Regeneration des Knorpels hindeutete (Abbildung 8 A). Exemplarische histologische Schnitte des Kniegelenkes an Tag 42 nach Induktion der OA machten die starken Schäden des Knorpels in WT-Mäusen im Vergleich zu MIA^{-/-} Mäusen deutlich (Abbildung 8 B).

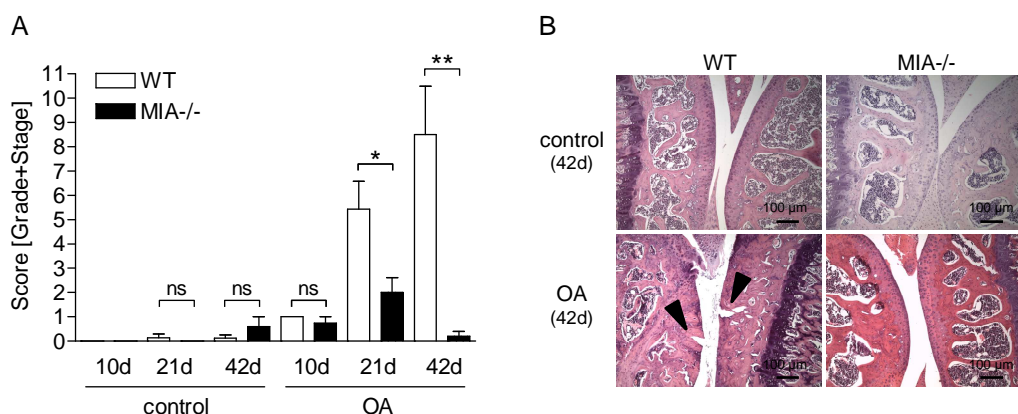


Abbildung 8: Experimentelle Induktion von Osteoarthritis (OA) durch Destabilisierung des Kniegelenkes in 6 Wochen alten WT und MIA-/- Mäusen. (A) Analyse der OA-Progression nach *Grade mal Stage*: 10, 21 und 42 Tage nach der Induktion. Die OA war in MIA-*knockout* (MIA-/-) Mäusen an Tag 21 und 42 deutlich reduziert. An Tag 42 wurde eine Verringerung der OA beobachtet, was auf eine Regeneration des Knorpels deutete. 10 Tage alte Kontrollmäuse wiesen einen Score von Null auf (ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). (B) Hämatoxylin-Eosin-Färbung an histologischen Schnitten von Kniegelenken 42 Tage nach Induktion der OA. Es ist ein starker Fortschritt der Osteoarthritis in WT-Mäusen zu erkennen. Der Knorpel von OA MIA-/- Mäusen weist hingegen keine Unterschiede zu den Kontrollmäusen auf. Die Pfeile markieren Läsionen im Knorpel (Schmid *et al.*, 2010).

Um den regenerativen Effekt der OA an Tag 42 in den MIA-/- Mäusen aufzuklären, wurden mögliche Unterschiede in der Proliferation von Chondrozyten untersucht. Es wurden dazu immunhistochemische Färbungen gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) an histologischen Schnitten des Kniegelenkes durchgeführt. Mit einer positiven Färbung für PCNA ließen sich die in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen nachweisen. Es wurde Tag 10 des OA Modells betrachtet, da bei einer beobachteten Regeneration an Tag 42 von einem Effekt zu einem früheren Zeitpunkt ausgegangen werden konnte. Erstaunlicherweise wurden nur in MIA-/- Mäusen proliferierende Chondrozyten nachgewiesen, jedoch keine in WT-Mäusen (Abbildung 9).

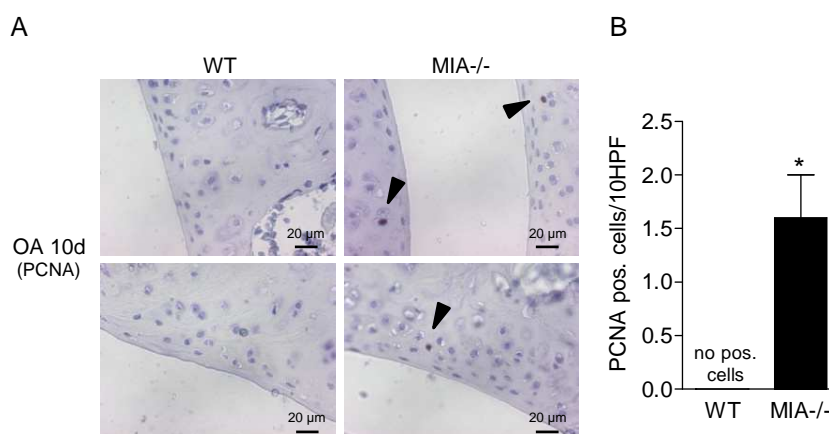


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von Histologischen Schnitten des Kniegelenkes gegen Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA). (A) Es konnten 10 Tage nach OA Induktion PCNA positiv gefärbte Chondrozyten in MIA-/- Mäusen nachgewiesen werden. Immunhistologische Färbungen an WT-Mäusen ergaben keine positiven Zellen. Die Pfeile markieren PCNA-positive Zellen. (B) Es wurde die Anzahl an PCNA-positive Zellen pro 10 Hauptgesichtsfelder (HPF: High Power Field) bestimmt (*: $p < 0,05$) (Schmid *et al.*, 2010).

Zur genaueren Analyse der Knorpelbildung in MIA-/- Mäusen wurde ein Frakturheilungsmodell angewandt, in dem die Knorpel- und Knochenbildung *de novo* im Frakturkallus beobachtet werden kann. Dafür wurde sechs bis acht Wochen alten Mäusen eine unstabilisierte Fraktur der Tibia zugefügt. Der sich gebildete Frakturkallus wurde nach 5, 7, 9 und 11 Tagen durch Anfertigung von histologischen Schnitten längs der Knochenachse und immunhistochemischen Färbungen analysiert.

Es gab keinen Unterschied in der Knochenbildung an Tag 5 und 7 nach der Fraktur zwischen WT- und MIA-/- Mäusen. An Tag 9 und 11 war die Knochenbildung in MIA-/- leicht reduziert (Abbildung 10 A). Interessanterweise war jedoch die Knorpelbildung an Tag 7 in MIA-/- Mäusen im Vergleich zu WT signifikant erhöht (Abbildung 10 B).

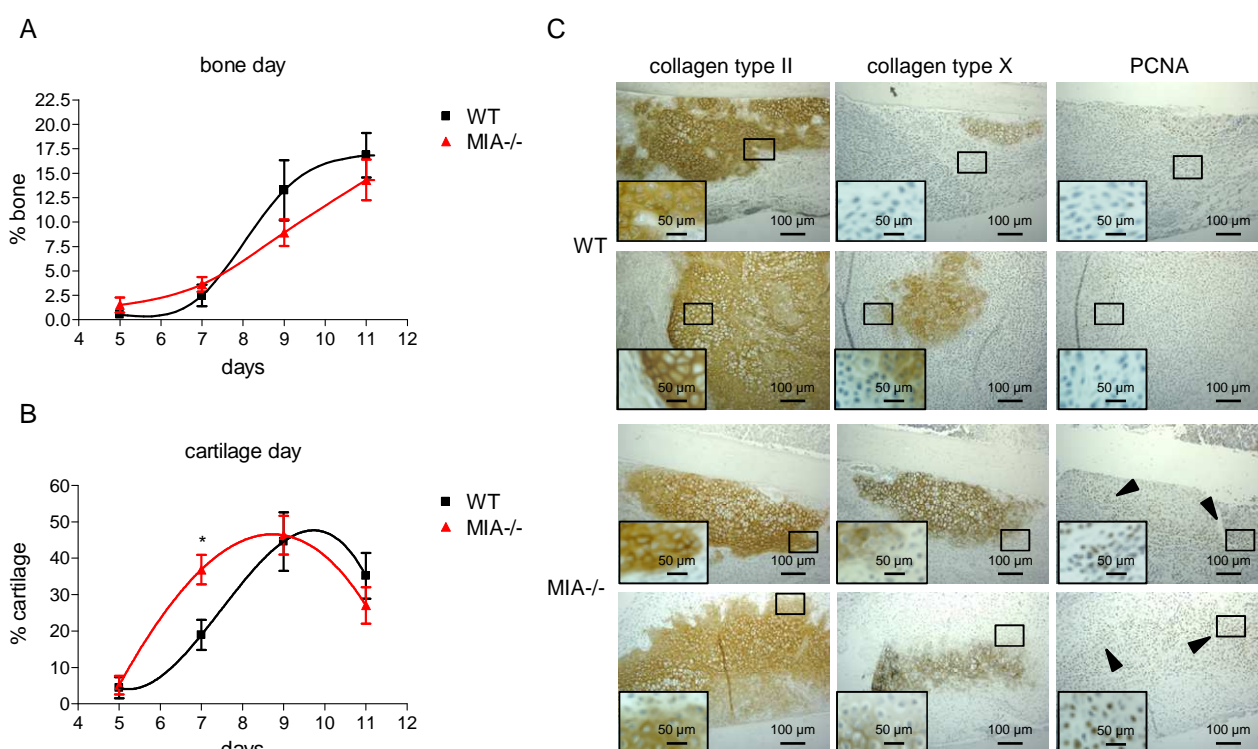


Abbildung 10: Unstabilisiertes Frakturheilungsmodell an der Tibia von 6-8 Wochen alten WT- und MIA-/- Mäusen. Analyse der Knorpel und Knochenbildung im Frakturkallus 5, 7, 9 und 11 Tage nach der Fraktur. (A) Die Knochenbildung war in MIA-/- Mäusen leicht reduziert. (B) Die Knorpelbildung war an Tag 7 der Fraktur in MIA-/- Mäusen im Vergleich zu WT signifikant erhöht (*: $p < 0,05$). (C) Immunhistochemische Färbungen gegen Kollagen Typ II, X und PCNA an Serienschritten des Frakturkalluses 7 Tage nach der Fraktur. Es sind mehr proliferierende Kollagen Typ II-positive Zellen in MIA-/- Mäusen als in WT-Mäusen zu erkennen. Die Pfeile markieren PCNA-positive und somit proliferierende Zellen. Die kleinen Kästchen im Schnitt markieren den vergrößerten Bereich, welcher annähernd dieselbe Stelle in jeweiligen Serienschritt darstellt (Schmid *et al.*, 2010).

An Tag 9 und 11 nach der Fraktur war kein Unterschied mehr in der Knorpelbildung zwischen WT- und MIA-/- Mäusen zu erkennen (Abbildung 10 B). Um die Unterschiede in der Knorpelbildung an Tag 7 der Frakturheilung genauer zu untersuchen, wurde die Knorpeldifferenzierung anhand von immunhistochemischen Färbungen untersucht. Es wurde die Expression eines zentralen Markers der Chondrozytendifferenzierung Kollagen Typ II

(Kravis und Upholt, 1985; Kosher *et al.*, 1986) und eines Markers für hypertrophe Chondrozyten Kollagen Typ X (Schmid und Linsenmayer, 1985) sowie die Proliferation durch PCNA-Färbungen an Serienschnitten des Frakturkalluses analysiert. Die Anzahl an Kollagen Typ II-positiven undifferenzierten Chondrozyten, die auch für PCNA-positiv waren und somit proliferieren, waren in MIA-/- Mäusen höher als in WT-Mäusen (Abbildung 10 C). Die erhöhte Knorpelbildung im Frakturkallus von MIA-/- Mäusen an Tag 7 war somit durch eine erhöhte Anzahl an proliferierenden Chondrozyten zu einem frühen Zeitpunkt der Heilung zu erklären.

3.1.2 Der Einfluss von MIA/CD-RAP auf Proliferation und Differenzierung in der Chondrogenese

Die *in vivo* Modelle zeigten eine erhöhte Regeneration des Knorpel-Gewebes in MIA-/- Mäusen durch eine erhöhte Proliferation. Ob MIA/CD-RAP bereits einen Einfluss auf die Proliferation von Zellen während der Chondrogenese hat, untersuchten wir den Effekt des MIA/CD-RAP-Verlustes auf Proliferation in *in vitro* Modellen unter Verwendung von zunächst undifferenzierten murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC), isoliert aus WT- und MIA-/- Mäusen.

Es wurde als Erstes die BrdU/Hoechst-Quenching-Technik angewandt, welche eine Analyse der Zellzyklusphasenverteilung der Zellen in bis zu drei aufeinander folgende Zellzyklen ermöglicht. Die Auswertung dieser Ergebnisse wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Gero Brockhoff durchgeführt.

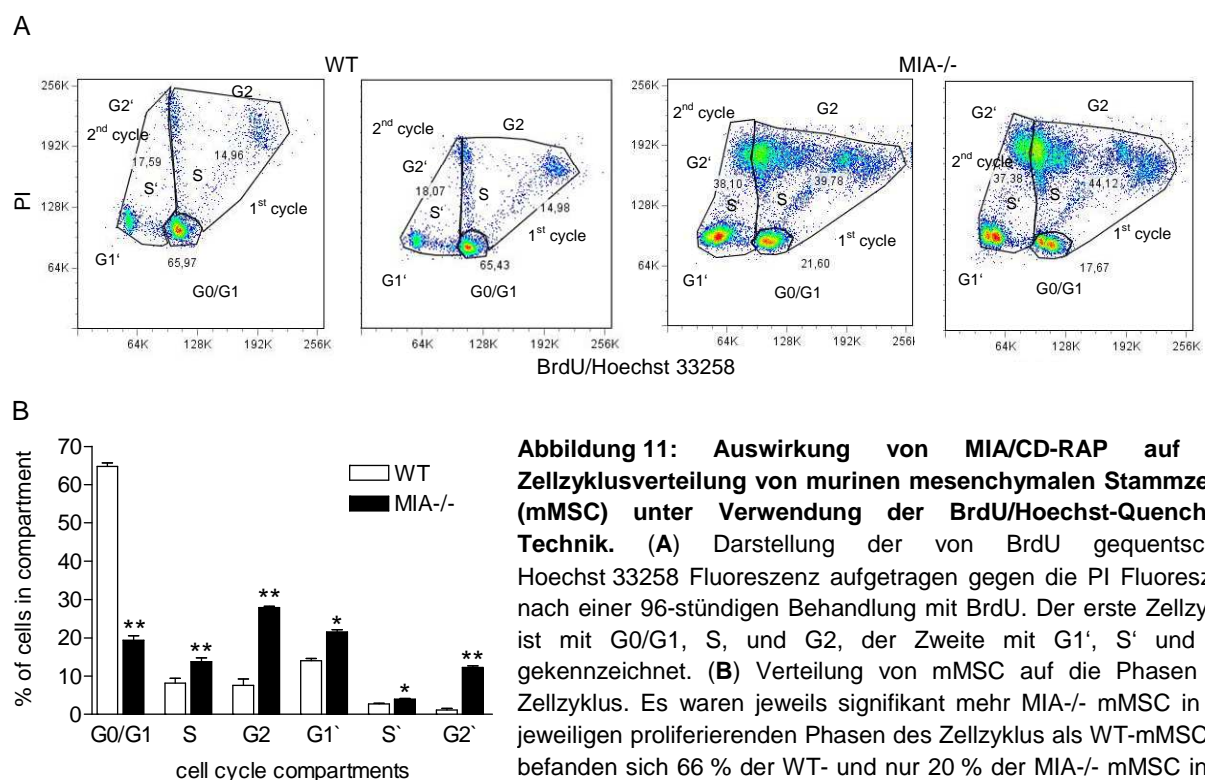


Abbildung 11 A zeigt den Effekt des MIA/CD-RAP-Verlustes auf die Verteilung der Zellzyklusphasen von mesenchymalen Stammzellen. Diese wurden nach einer 96-stündigen Behandlung mit BrdU mit Hoechst 33258 und PI gefärbt. Nach 96 Stunden sind mehr MIA/-mMSC in den ersten (\varnothing 42 %) und zweiten (\varnothing 38 %) Zellzyklus eingetreten als WT-mMSC (Erster: \varnothing 15 %, Zweiter: \varnothing 18 %) (Abbildung 11 A). Eine große Anzahl von WT-Zellen (\varnothing 66 %) proliferierten nicht und befanden sich noch in der G0/G1 Phase des ersten Zellzykluses. Unter MIA/CD-RAP-Defizienz waren durchschnittlich nur 20 % in der G0/G1 Phase. Beim Vergleich der Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Zellzyklusphasen zwischen WT- und MIA/- mMSC waren in MIA/- jeweils signifikant mehr Zellen in der jeweiligen proliferierenden Phase als in WT (Abbildung 11 B). Zusammenfassend zeigte dieser Versuch, dass der Verlust von MIA/CD-RAP die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen fördert.

Aus nicht publizierten RNA-Array Experimenten, in denen die mRNA-Expression in murinen Chondrozyten zwischen WT- und MIA/- Mäusen verglichen wurde, war bereits eine erhöhte Cyclin D2-Expression in MIA/- Chondrozyten bekannt. Cyclin D2 ist ein Mitglied der Typ-D Cyclin Familie, welches an CDK4 oder CDK6 (cyclin-dependent-kinase) bindet und diese aktiviert (Tashiro *et al.*, 2007). Der aktivierte Cyclin D2-CDK4/6-Komplex phosphoryliert weitere Proteine, welche für den Fortschritt des Zellzyklus von der G0/G1 in die S-Phase essenziell sind. Cyclin D2 ist somit ein wichtiger Initiator der Zellproliferation (Kobayashi *et al.*, 2009). Es wurde die Cyclin D2-mRNA-Expression per quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) und die Cyclin D2-Proteinexpression per Western Blot in mesenchymalen Stammzellen untersucht. In Übereinstimmung mit den Expressions-Daten aus dem RNA-Array konnte eine signifikant erhöhte Cyclin D2 mRNA- und Proteinexpression in MIA/- mMSC festgestellt werden (Abbildung 12 A). Zur Bestätigung der Cyclin D2 Beteiligung wurde die MIA/CD-RAP-Expression per siRNA-Technologie in WT-mMSC herunterreguliert bzw. humanes MIA/CD-RAP in MIA/- mMSC reexprimiert. Die Effizienz der Herunterregulation bzw. der Reexpression von MIA/CD-RAP wurde per qRT-PCR analysiert (Abbildung 13).

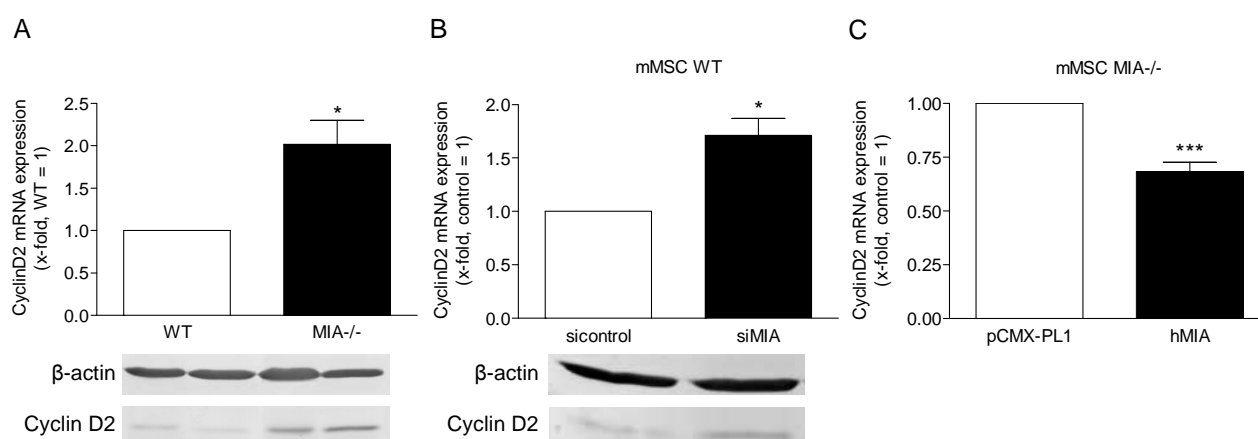


Abbildung 12: Analyse der Cyclin D2-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR und Proteinebene mittels Western Blot in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP. (A) Die Cyclin D2-Expression war in MIA^{-/-} mMSC im Vergleich zu WT-mMSC signifikant erhöht. In der Western Blot Analyse sind jeweils 2 Chargen unbehandelter mMSC dargestellt (*: $p < 0,05$). (B) WT-mMSC transfiziert mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA zeigten eine signifikant erhöhte Cyclin D2-Expression im Vergleich zur siKontrolle (*: $p < 0,05$). (C) Die Reexpression von humanem MIA/CD-RAP in MIA^{-/-} mMSC führte zu einer signifikant verminderten Cyclin D2 mRNA-Expression im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen (***: $p < 0,001$). Die Proteinexpression von β -Aktin diente als Ladekontrolle (Schmid *et al.*, 2010).

Wie erwartet, führte die Herunterregulation von MIA/CD-RAP in WT-mMSC zu einer signifikanten Überexpression von Cyclin D2 auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 12 B). Die Reexpression von humanem MIA/CD-RAP in MIA^{-/-} mMSC hemmte die Cyclin D2-mRNA-Expression signifikant (Abbildung 12 C). Demzufolge hat der Verlust von MIA/CD-RAP eine vermehrte Cyclin D2-Expression in mesenchymalen Stammzellen zur Folge, was auf eine erhöhte Proliferation deutet. Der Einfluss auf die Proliferation wurde in den folgenden funktionellen Studien genauer analysiert.

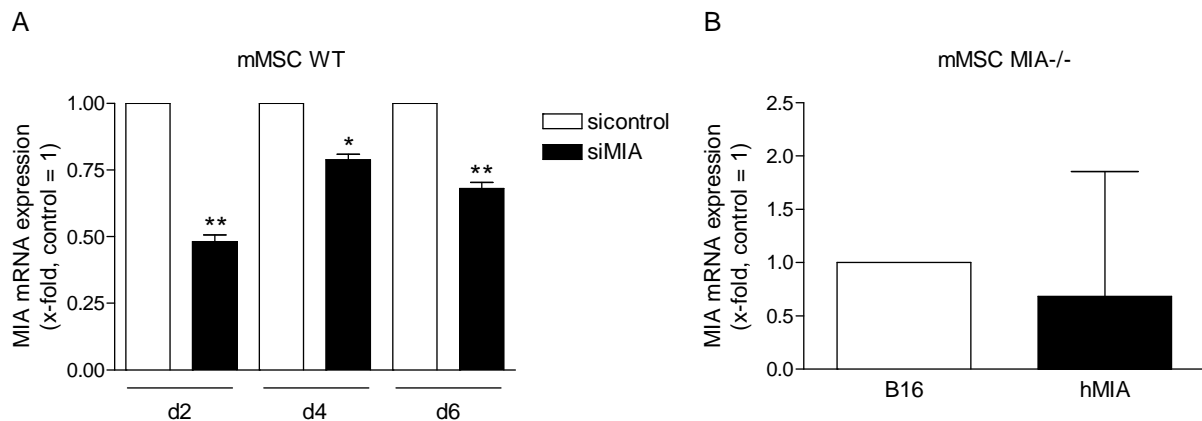


Abbildung 13: Nachweis der Verringerung der MIA/CD-RAP-Expression per siRNA bzw. der MIA/CD-RAP Reexpression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR. (A) Die MIA/CD-RAP-mRNA-Expression wurde in WT-mMSC im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen signifikant auf bis zu 50 % herunterreguliert (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$) (Schmid *et al.*, 2010). (B) Die Transfektion des humanen MIA/CD-RAP Expressionskonstrukts in MIA^{-/-} mMSC führte zu einer Erhöhung der MIA/CD-RAP-mRNA-Expression auf Niveau der murinen Melanomzelllinie B16 (unveröffentlichte Daten).

Um den Effekt des MIA/CD-RAP-Verlusts auf Proliferation unter chondrogenen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen aus WT- und MIA^{-/-} Mäusen unter Zuhilfenahme des XTT Proliferations-Assay über einen Zeitraum von 8 Tagen bestimmt. Die chondrogene Differenzierung wurde durch die Zugabe von 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. TGF- β 3 fördert die Chondrogenese in Micromass Kulturen indem es den Differenzierungsprozess von mesenchymalen Zellen initiiert (Roark und Greer, 1994). Eine spätere Studie konnte zeigen, dass TGF- β 3 bereits in der mesenchymalen Kondensation eine Rolle spielt. TGF- β 3 inhibiert die Proliferation von mesenchymalen Zellen und fördert deren Kondensation, was für die weitere chondrogene Differenzierung essentiell ist (Jin *et al.*, 2007). Die Behandlung mit TGF- β 3 führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen

Proliferationsrate in WT-mMSC, wobei diese in MIA^{-/-} mMSC hingegen unverändert blieb (Abbildung 14 A). Im Vergleich zur Kontrolle führte die Herunterregulation von MIA/CD-RAP per siRNA zu keiner signifikanten Veränderung der relativen Proliferationsrate nach der Induktion der Differenzierung durch TGF- β 3 (Abbildung 14 B).

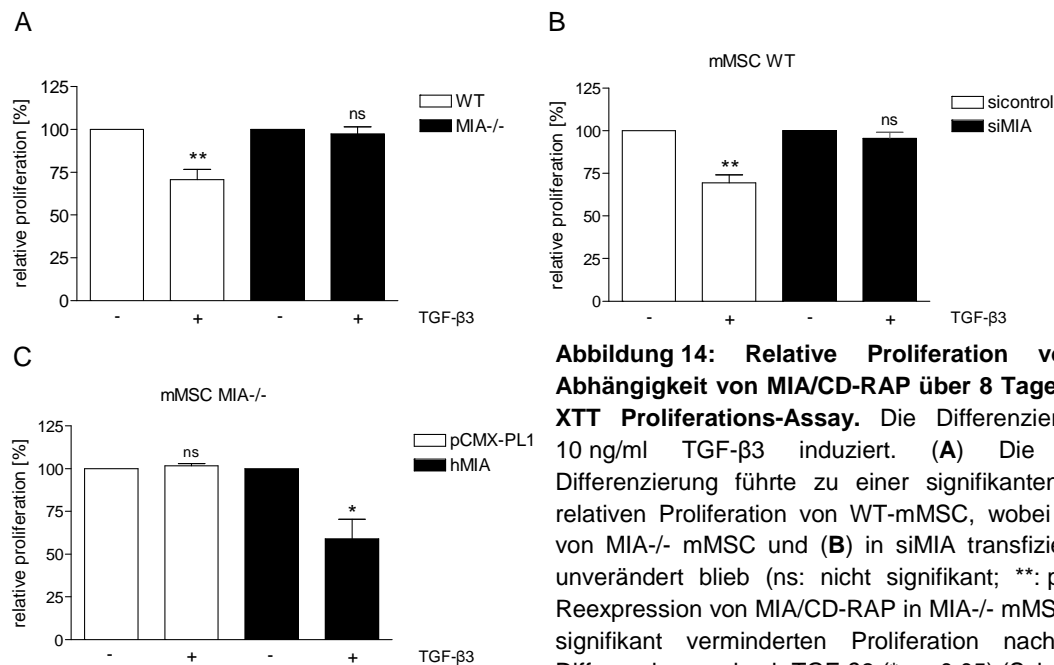


Abbildung 14: Relative Proliferation von mMSC in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP über 8 Tage untersucht per XTT Proliferations-Assay. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. **(A)** Die Induktion der Differenzierung führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Proliferation von WT-mMSC, wobei die Proliferation von MIA^{-/-} mMSC und **(B)** in siMIA transfizierten WT-mMSC unverändert blieb (ns: nicht signifikant; **: $p < 0,01$). **(C)** Die Reexpression von MIA/CD-RAP in MIA^{-/-} mMSC führte zu einer signifikant verminderten Proliferation nach Induktion der Differenzierung durch TGF- β 3 (*: $p < 0,05$) (Schmid *et al.*, 2010).

Die Reexpression von humanem MIA/CD-RAP in MIA^{-/-} mMSC führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Proliferationsrate unter dem Einfluss von TGF- β 3, was einer Wiederherstellung des WT-Phänotyps entspricht (Abbildung 14 C).

Diese Ergebnisse beweisen eine verlängerte Proliferation von mesenchymalen Zellen durch den Verlust von MIA/CD-RAP und es wird eine verspätete Kondensation sowie Differenzierung zu Chondrozyten vermutet.

Um nun den Einfluss von MIA/CD-RAP auf die chondrogene Differenzierung zu untersuchen, wurde die transkriptionelle Aktivität des *COL2A1*-Promotors (Col2Luc) (Tan *et al.*, 2003) in WT- und MIA^{-/-} mMSC in Luciferase-Reporter-Gen-Assays getestet. Col2a1 ist ein spezifischer Marker der Chondrogenese (Kravis und Upholt, 1985; Kosher *et al.*, 1986) und eignet sich daher gut, um die Effekte von MIA/CD-RAP auf die Chondroblastendifferenzierung zu untersuchen. Die Differenzierung wurde wieder mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. Der *COL2A1*-Promotor war in MIA^{-/-} mMSC signifikant weniger aktiv als in WT-mMSC (Abbildung 15 A). Dies konnte in WT-mMSC, in denen MIA/CD-RAP durch siRNA herunterreguliert wurde, bestätigt werden (Abbildung 15 B). Es gibt somit erste Hinweise, dass MIA/CD-RAP eine wichtige Rolle in der Aktivierung der *COL2A1*-Transkription und somit in der Initiierung der Chondrogenese spielt.

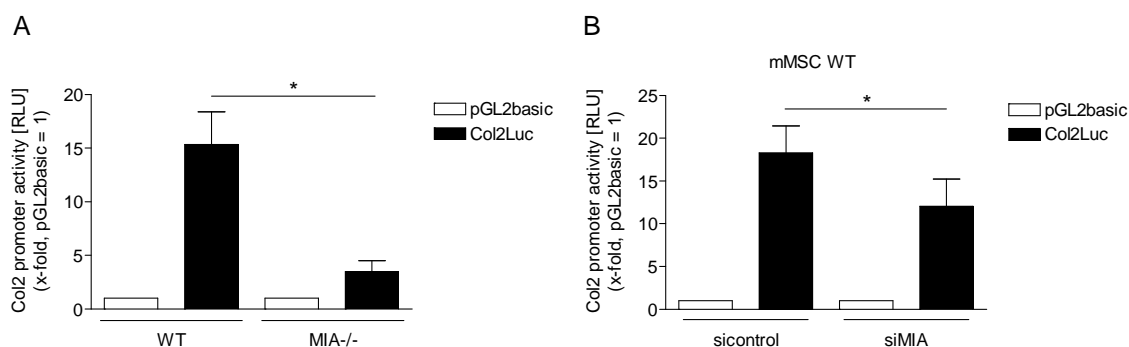


Abbildung 15: Einfluss von MIA/CD-RAP auf die COL2A1-Promotoraktivität bestimmt per Reporter-Gen-Assays. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. (A) Die COL2A1-Promotoraktivität war in MIA-/- mMSC im Vergleich zu WT-mMSC signifikant reduziert (*: $p < 0,05$). (B) WT-mMSC transfiziert mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA zeigten eine signifikant verminderte COL2A1-Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle (*: $p < 0,05$) (Schmid *et al.*, 2010).

3.1.3 Die Regulation des 54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein (p54^{nrb}) durch MIA/CD-RAP

Um die funktionellen Aspekte von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese weiter zu untersuchen, wurden Erfahrungen mit MIA/CD-RAP im Melanom herangezogen. Eine von der Abteilung für Molekulare Pathologie (Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführte PowerBlot Western Array Analyse zur Identifizierung von MIA/CD-RAP regulierten Proteinen im malignen Melanom offenbarte p54^{nrb} als MIA/CD-RAP reguliertes Protein (Abbildung 16 A). Hierzu wurde die Expression in der Melanomzelllinie HMB2 mit dem stabil transfizierten Zellklon HMB2 -MIA5, in dem die MIA/CD-RAP-Expression durch Transfektion eines *antisense*-Konstrukts herunterreguliert wurde (Poser *et al.*, 2004; Tatzel *et al.*, 2005), verglichen. In einer Studie von Hata (Hata *et al.*, 2008) wurde p54^{nrb} als Verstärker der Sox9-abhängigen COL2A1-Transkription im Knorpel beschrieben. Zusammen mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.2, in dem eine MIA/CD-RAP-abhängige Regulation des COL2A1-Promotors gezeigt werden konnte, lag der weitere Fokus auf der Untersuchung der MIA/CD-RAP-abhängigen p54^{nrb}-Regulation. Hierzu wurden 3D Sphäroid Kulturen und mRNA-Expressionsanalysen von Sibylla Loder Meyer und immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von Rudolf Jung (jeweils Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt. Es wurde die p54^{nrb}-mRNA-Expression per qRT-PCR an RNA isoliert aus Knorpel von Ohr und *Processus xiphoideus* des Sternums von adulten Mäusen (Abbildung 16 B), sowie die p54^{nrb}-Proteinexpression per Immunhistochemie an Rippen von 15,5 Tage alten Embryonen (Abbildung 16 C) untersucht. In allen Fällen konnte eine signifikant Verminderung der p54^{nrb}-Expression in MIA-/- Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen gezeigt werden (Abbildung 16 A, B). Als nächstes wurde die p54^{nrb}-mRNA-Expression während der Redifferenzierung von dedifferenzierten Chondrozyten aus WT- und MIA-/- Mäusen in dreidimensionalen Pellet Kulturen über 6 Tage betrachtet. Es konnte ein Anstieg der p54^{nrb}-Expression in WT-

Chondrozyten nach Behandlung mit 10 ng/ml TGF- β 3 beobachtet werden. Die p54^{nrb}-mRNA-Expression in MIA^{-/-} Chondrozyten war an Tag 3, 5 und 6 im Vergleich zu WT signifikant reduziert (Abbildung 16 D).

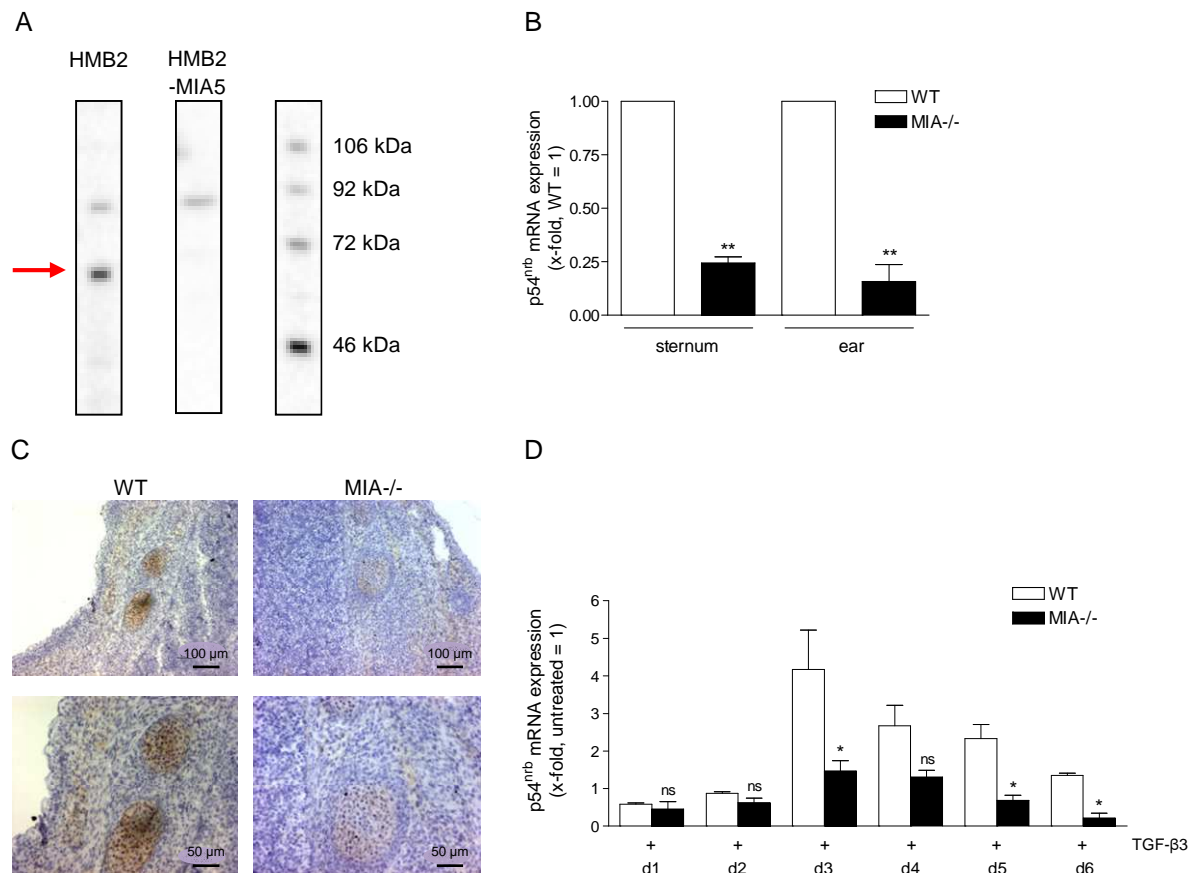


Abbildung 16: Expression von p54^{nrb} in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP. (A) Eine PowerBlot Analyse von MIA/CD-RAP-negativen HMB2 Zellklonen HMB2 -MIA5 Zellklonen zeigte eine stark verminderte p54^{nrb}-Proteinexpression im Vergleich zu HMB2 Zellen. Der Pfeil markiert die p54^{nrb} Bande. (B) Die p54^{nrb}-mRNA-Expression untersucht durch qRT-PCR war in Knorpel von *Processus xiphoideus* (Sternum) und Ohr von MIA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT signifikant reduziert (**: p<0,05). (C) Immunhistochemische Färbung an Rippen von 15,5 Tage alten Embryonen mit p54^{nrb}-spezifischem Antikörper zeigte eine verminderte Proteinexpression in MIA^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT. (D) Expression von p54^{nrb}-mRNA in der Redifferenzierung von murinen Chondrozyten in 3D Pellet Kulturen über 6 Tage gemessen per qRT-PCR. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. Die p54^{nrb}-mRNA-Expression war signifikant vermindert in MIA^{-/-} Chondrozyten im Vergleich zu WT an Tag 3, 5 und 6 (*: p<0,05) (Schmid *et al.*, 2010).

3.1.4 Die Rolle von p54^{nrb} in der MIA/CD-RAP vermittelten Chondrogenese

Um den Einfluss von MIA/CD-RAP reguliertem p54^{nrb} auf Differenzierung und Proliferation in der frühen Chondrogenese zu untersuchen, wurde siRNA-Technologie gegen p54^{nrb} eingesetzt. Die Effizienz der p54^{nrb} siRNA Transfektion in WT-mMSC wurde auf mRNA-Ebene per qRT-PCR und auf Proteinebene per Western Blot Analyse bestimmt (Abbildung 17 A). Für die Analyse der frühen Chondrogenese wurde erneut die transkriptionelle Aktivität des *COL2A1*-Promotors in mMSC per Luciferase-Reportergen-Assays bzw. dessen mRNA-Expression per qRT-PCR bestimmt.

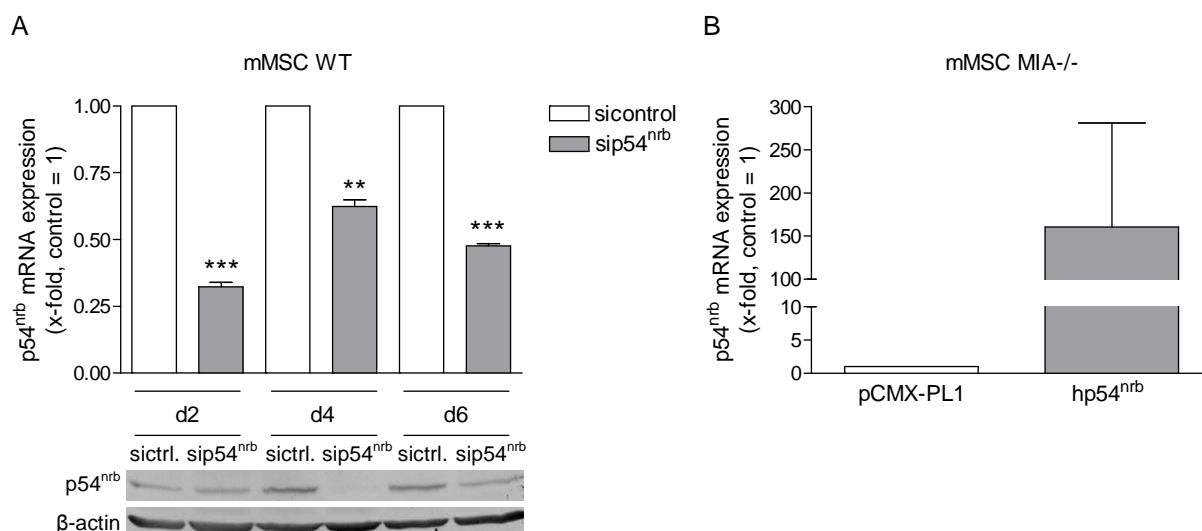


Abbildung 17: Nachweis der Verringerung der p54^{nrb}-Expression per siRNA auf Proteinebene mittels Western Blot und mRNA-Ebene per qRT-PCR bzw. der p54^{nrb} Überexpression auf mRNA-Ebene per qRT-PCR. (A) Die p54^{nrb}-mRNA-Expression wurde in WT-mMSC signifikant auf bis zu 30% im Vergleich zur Expression in Kontroll-siRNA behandelten Zellen herunterreguliert (*: p<0,05; **: p<0,01). Das Maximum der p54^{nrb}-Proteininhibition wurde an Tag 4 erreicht. Die β-Aktin-Proteinexpression diente als Ladekontrolle (Schmid *et al.*, 2010). (B) Die Transfektion des humanen p54^{nrb}-Expressionskonstrukts in MIA^{-/-} mMSC führte zu einer deutlichen Erhöhung der p54^{nrb}-mRNA-Expression im Vergleich zum Leervektor (unveröffentlichte Daten).

Durch die Transfektion p54^{nrb}-spezifischer siRNA kam es zu einer signifikanten Reduktion der COL2A1-Promotoraktivität (Abbildung 18 A) sowie der mRNA-Expression (Abbildung 18 B) im Vergleich zu kontroll-transfizierten WT-mMSC. Interessanterweise passen diese Ergebnisse zu den beobachteten Effekten in MIA^{-/-} mMSC und in WT-mMSC transfiziert mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA (Abbildung 15). Die Herunterregulation der p54^{nrb}-Expression per siRNA in MIA^{-/-} mMSC führte weder zu einer signifikanten Veränderung der COL2A1-Promotoraktivität (Abbildung 18 C) noch zu einer signifikanten Veränderung der mRNA-Expression (Abbildung 18 D). Ein p54^{nrb}-Effekt war folglich nur in WT-mMSC nachweisbar.

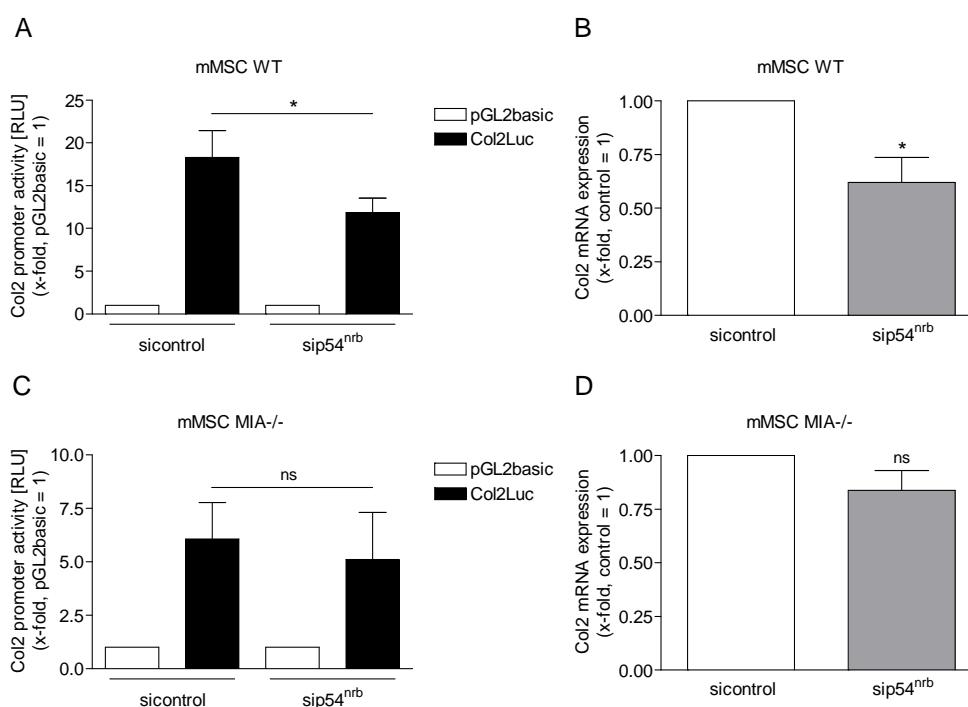


Abbildung 18: Einfluss von p54^{nrb} auf die COL2A1-Promotoraktivität bestimmt per Reporter-Gen-Assays und auf die Col2a1-mRNA-Expression analysiert per qRT-PCR. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. (A) Die COL2A1-Promotoraktivität war in WT-mMSC transfiziert mit p54^{nrb}-spezifischer siRNA signifikant reduziert (*: $p < 0,05$). (B) Es konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Col2a1-mRNA-Expression in sip54^{nrb}-transfizierten WT-mMSC nachgewiesen werden (*: $p < 0,05$). (C) Die Inhibition der p54^{nrb}-Expression per spezifischer siRNA in MIA^{-/-} mMSC konnte weder die COL2A1-Promotoraktivität noch (D) die Col2a1-mRNA-Expression signifikant reduzieren (ns: nicht signifikant) (Schmid *et al.*, 2010).

Zur Bestätigung der Regulation der COL2A1-Transkription durch MIA/CD-RAP über p54^{nrb} wurde humanes MIA/CD-RAP in MIA^{-/-} mMSC reexprimiert und die p54^{nrb}-Expression gleichzeitig per siRNA vermindert. Wie erwartet führte die Reexpression von MIA/CD-RAP zu einem Anstieg der COL2A1-Promotoraktivität, wobei bei gleichzeitiger Herunterregulation der p54^{nrb}-Expression die Promotoraktivität signifikant vermindert war (Abbildung 19). MIA^{-/-} mMSC transfiziert mit dem pCMX-PL1 Kontroll-Vektor zeigten keinen signifikanten Unterschied in der COL2A1-Promotoraktivität in Abhängigkeit von der p54^{nrb}-Expression (Abbildung 19). Folglich konnte bestätigt werden, dass MIA/CD-RAP die COL2A1-Genexpression und somit die Initiierung der Chondrogenese über p54^{nrb} reguliert.

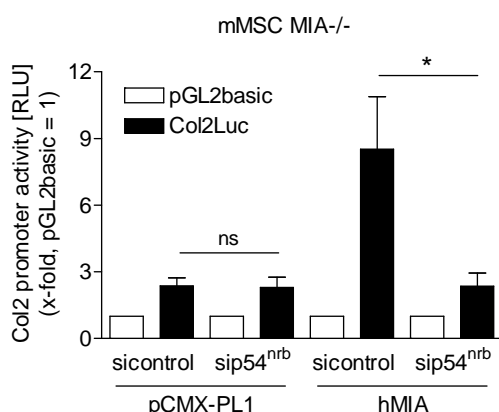


Abbildung 19: Bestimmung der COL2A1-Promotoraktivität per Reporter-Gen-Assay. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. Die Reexpression von MIA/CD-RAP in MIA^{-/-} mMSC führte zur Induktion der COL2A1-Promotoraktivität. Bei gleichzeitiger Inhibition der p54^{nrb}-Expression per spezifischer siRNA wurde die Promotoraktivität signifikant reduziert (*: $p < 0,05$). Zellen transfiziert mit dem pCMX-PL1 Kontroll-Vektor zeigten keine signifikante Veränderung der Promotoraktivität in Abhängigkeit von p54^{nrb} (ns: nicht signifikant) (Schmid *et al.*, 2010).

Es wurde nun untersucht, ob der gezeigte Effekt von MIA/CD-RAP auf die Cyclin D2-Expression und Proliferation ebenfalls von p54^{nrb} vermittelt wird. WT-mMSC transfiziert mit p54^{nrb}-spezifischer siRNA zeigten eine signifikant erhöhte Cyclin D2-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrolle (Abbildung 20 A). Die Überexpression von humanem p54^{nrb} in MIA^{-/-} mMSC führte zu einer signifikanten Reduktion der Cyclin D2-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20 B). Die Effizienz der p54^{nrb}-Überexpression in MIA^{-/-} mMSC wurde auf mRNA-Ebene per qRT-PCR bestätigt (Abbildung 17 B).

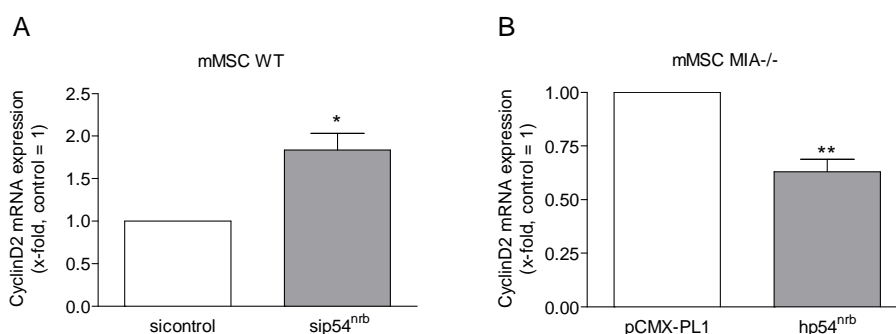


Abbildung 20: Analyse der Cyclin D2-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in Abhängigkeit von p54^{nrb}. (A) WT-mMSC transfiziert mit p54^{nrb}-spezifischer siRNA zeigten eine signifikante Erhöhung der Cyclin D2-mRNA-Expression im Vergleich zur siKontrolle (*: p<0,05). (B) Die Überexpression von humanem p54^{nrb} in MIA-/- mMSC führte zu einer signifikanten Verminderung der Cyclin D2-mRNA-Expression im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen (**: p<0,01) (Schmid *et al.*, 2010).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abbildung 14 B und C zeigten WT-mMSC in denen die p54^{nrb}-Expression per siRNA herunterreguliert wurde keine Veränderung der relativen Proliferation nach Induktion der Differenzierung durch TGF-β3 (Abbildung 21 A). Überexprimierte man p54^{nrb} in MIA-/- mMSC, kam es zu einer signifikanten Reduktion der relativen Proliferationsrate nach Behandlung mit TGF-β3 (Abbildung 21 B). Diese Ergebnisse zeigten, dass MIA/CD-RAP und p54^{nrb} denselben Effekt auf die Proliferation von mMSC haben.

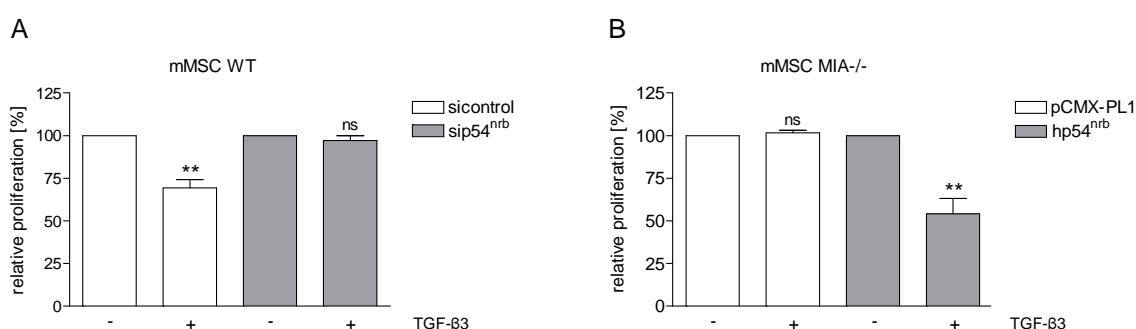


Abbildung 21: Relative Proliferation von mMSC in Abhängigkeit von p54^{nrb} über 8 Tage untersucht per XTT Proliferations-Assay. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF-β3 induziert. (A) Die Induktion der Differenzierung führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen Proliferation von WT-mMSC, wobei sie in sip54^{nrb} transfizierten WT-mMSC und (B) in MIA-/- mMSC unverändert blieb (ns: nicht signifikant; **: p<0,01). Die Überexpression von p54^{nrb} in MIA-/- mMSC führte zu einer signifikant verminderten Proliferation nach Induktion der Differenzierung durch TGF-β3 (**: p<0,01) (Schmid *et al.*, 2010).

Die Reexpression von humanem MIA/CD-RAP unter gleichzeitiger Verminderung der p54^{nrb}-Expression per siRNA in MIA-/- mMSC hatte trotz Induktion der Differenzierung mit TGF-β3 keine Verminderung der relativen Proliferationsrate zur Folge (Abbildung 22). Wie bereits in Abbildung 14 C gezeigt wurde, führte die Reexpression von humanem MIA/CD-RAP zu einer Verminderung der relativen Proliferationsrate nach TGF-β3-Behandlung (Abbildung 22).

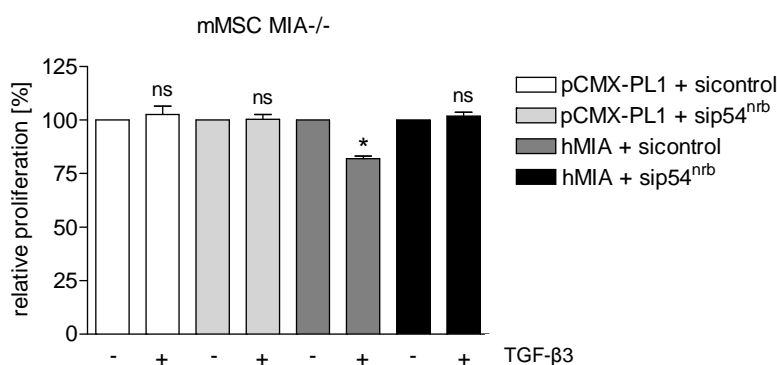


Abbildung 22: Bestimmung der relativen Proliferation per XTT Proliferations-Assay. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF-β3 induziert. Die Reexpression von MIA/CD-RAP in MIA-/- mMSC führte zu einer Verminderung der relativen Proliferation nach Induktion der Differenzierung (*: p<0,05). Die gleichzeitige Inhibition der p54^{nrb}-Expression per spezifischer siRNA führte zu keiner signifikanten Veränderung der relativen Proliferationsrate trotz Behandlung mit TGF-β3 (ns: nicht signifikant) (Schmid *et al.*, 2010).

Es konnte somit gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP über $p54^{nrb}$ die Chondrogenese fördert, indem die Proliferation über eine Inhibition der Cyclin D2-Expression gehemmt wird und die Differenzierung über die Aktivierung der *COL2A1*-Transkription verstärkt wird.

3.1.5 Die Beteiligung des MAPK/ERK-Signalweges an der MIA/CD-RAP-abhängigen Regulation von $p54^{nrb}$

In diesem Teilabschnitt wurde untersucht, über welchen Signalweg das sezernierte Protein MIA/CD-RAP die $p54^{nrb}$ -Expression reguliert. Es ist bereits bekannt, dass MIA/CD-RAP die ERK-Aktivität inhibiert, indem es die Integrin alpha 4 beta 1- und alpha 5 beta 1-Aktivität durch direkte Bindung negativ reguliert (Bauer *et al.*, 2006). Auch in humanen Chondrozyten führt eine Bindung von MIA/CD-RAP an Integrin alpha 5 zur dessen Inaktivierung und zu einer Hemmung der Aktivität von ERK (Schubert *et al.*, 2010).

Im nächsten Schritt wurde die Rolle des MAPK/ERK-Signalweges in der Regulation der $p54^{nrb}$ -Expression analysiert. Dazu wurde der MAPK/ERK-Signalweg spezifisch durch die Behandlung von WT-mMSC mit 20 μ M der MEK1/2-Inhibitoren PD98059 und UO126 für 2 Tage inhibiert. Es konnte keine Veränderung der $p54^{nrb}$ -Expression, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene festgestellt werden (Abbildung 23).

Der MAPK/ERK-Signalweg ist somit nicht an der MIA/CD-RAP-abhängigen Regulation der $p54^{nrb}$ -Expression beteiligt.

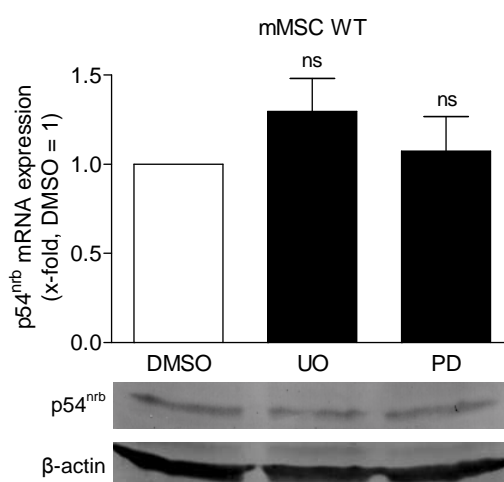


Abbildung 23: Beteiligung des MAPK/ERK Signalweges an der Regulation von $p54^{nrb}$. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. Die Inhibition des MAPK/ERK Signalweges mit den MEK1/2-Inhibitoren UO126 und PD98059 in WT-mMSC führte zu keiner signifikanten Veränderung der $p54^{nrb}$ -Expression, weder auf mRNA-Ebene, bestimmt per qRT-PCR, noch auf Proteinebene bestimmt per Western Blot (ns: nicht signifikant) (Schmid *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung konnten bereits veröffentlicht werden (Schmid *et al.*, 2010).

3.2 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von p54^{nrb} durch MIA/CD-RAP

Unter Punkt 3.1.3 konnte eine MIA/CD-RAP-abhängige Regulation der p54^{nrb}-Expression im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass p54^{nrb} die Funktionen von MIA/CD-RAP in der Förderung der Chondrogenese vermittelt (siehe 3.1.4). Im malignen Melanom wurde ebenfalls eine verstärkte p54^{nrb}-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen. Dabei ist p54^{nrb} als Zielmolekül von MIA/CD-RAP an der Entstehung und Progression des malignen Melanoms beteiligt (Schiffner *et al.*, 2011).

Um die MIA/CD-RAP-vermittelten Effekte in der Chondrogenese zu verstehen, sollte im zweiten Abschnitt dieser Arbeit die Regulation von p54^{nrb} durch MIA/CD-RAP untersucht werden. Dabei fokussierten sich die Untersuchungen auf die Regulation der p54^{nrb}-Transkription. Für diesen Zweck wurden zwei unterschiedliche MIA/CD-RAP-defiziente Modellsysteme verwendet, um die MIA/CD-RAP-abhängige Regulation von p54^{nrb} zu untersuchen. Es wurden zum einen Mesenchymalen Stammzellen aus Wildtyp- und MIA^{-/-} Mäusen und zum anderen die unter Abschnitt 3.1.3 beschriebenen MIA/CD-RAP-negativen HMB2 Zellklone HMB2^{-MIA5} verwendet. Zusätzlich wurde die leicht kultivierbare und transfizierbare Melanomzelllinie Mel Im unter Verwendung von MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA als weiteres Modellsysteme herangezogen. Die Melanomzelllinien HMB2 und Mel Im dienten dabei nur als weitere MIA/CD-RAP-negative Zellsysteme.

Im ersten Schritt wurde im bis jetzt noch nicht charakterisierten p54^{nrb}-Promotor nach Sequenzübereinstimmungen gesucht, indem die Promotorregionen von verschiedenen Vertretern der Placentalia verglichen wurden.

3.2.1 *In silico* Analyse der p54^{nrb}-Promotorregion

Um eine konservierte Region im p54^{nrb}-Promotor von Ratte, Maus, Hund, Kuh, Rhesusaffe, Schimpanse und Mensch zu definieren, wurde eine *in silico* Analyse unter Verwendung des ECR- (evolutionary conserved region) Browsers (<http://ecrbrowser.dcode.org>) durchgeführt. Mit Hilfe dieses Programmes können in der Evolution konservierte Bereiche in den Genomen von verschiedenen Arten dargestellt werden. Hier wurde das menschliche Genom als Referenz genommen und paarweise mit den Genomen der anderen Arten verglichen. Das Programm detektiert dabei Sequenzelemente von signifikanter Länge, welche zwischen den beiden Genomen durch ein bestimmtes Maß an Sequenzgleichheit konserviert sind. Diese Stellen werden als ECRs bezeichnet und grafisch in Form von Spitzen hervorgehoben. Die x-Achse stellt dabei die Lage im Genom dar und die y-Achse die Sequenzgleichheit in % zwischen dem Referenz- und dem Vergleichsgenoms an dieser festgeschriebenen Position.

Das Programm deckte eine hoch konservierte Region von ca. 1600 bp direkt oberhalb des 5'-Endes des $p54^{nrB}$ -Gens unter den Vertretern der Placentalia auf (Abbildung 24 A). Für genauere Promotoranalysen wurde der Sequenzabschnitt aus Mensch und Maus, welcher diesen konservierten Bereich enthält, in den pGL4.10[*luc2*] Luciferase-Reportervektor kloniert. Der klonierte Bereich reichte dabei im Menschen von -8436 bis -6833 bp ($hp54^{nrB}$) und in der Maus von -9160 bis -7461 bp ($mp54^{nrB}$) relativ zum Translationsstart (Abbildung 24 B und C). Dabei wurde die erste Base *stromaufwärts* vor dem ATG Start Codon mit der relativen Positionsnummer -1 deklariert.

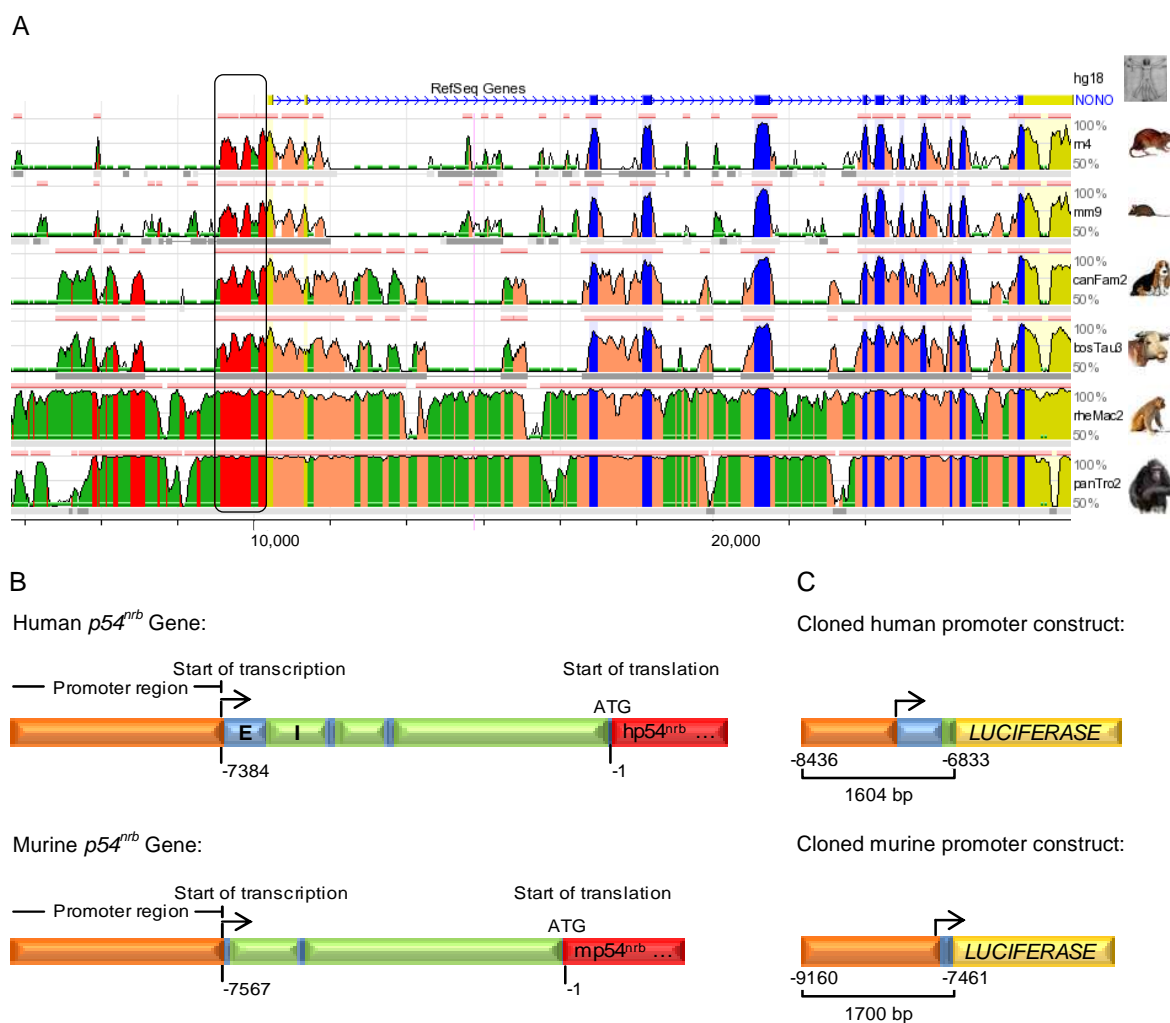


Abbildung 24: In silico Analyse der $p54^{nrB}$ -Promotorregion innerhalb Vertretern der Placentalia. (A) Vergleichende genomische Analyse des $p54^{nrB}$ -Gens und dessen 5' stromaufwärts liegenden Bereichs unter Verwendung des ECR-Browsers. Die genomische Sequenz des $p54^{nrB}$ -Gens von Mensch, Ratte, Maus, Hund, Kuh, Rhesusaffe und Schimpanse wurde verglichen. (rot) Region zwischen Genen; (lachsfarben) Region innerhalb eines Gens; (blaue Kästchen) kodierende Exone; (gelbe Kästchen) 5'- und 3'-UTR; (grün) Transposons und einfache Wiederholungen; (pinke Balken) in der Evolution konservierter Bereich (ECR). Die x-Achse stellt die Lage im Genom dar. Die y-Achse stellt die Sequenzübereinstimmung in % zwischen Referenz- und Vergleichs-genom an der jeweiligen Position dar. Der Kasten markiert eine in der Evolution konservierten Bereich innerhalb Vertretern der Placentalia. **(B)** Schematische Darstellung des humanen und murinen $p54^{nrB}$ -Gens. **(C)** Für Promotoranalysen wurde der humane ($hp54^{nrB}$ Luc) und murine ($mp54^{nrB}$ Luc) Sequenzabschnitt in den pGL4.10[*luc2*] Reportervektor kloniert, welcher den konservierten Bereich enthält. Der Sequenzabschnitt reichte dabei von -8436 bis -6833 bp im Humanen bzw. von -9160 bis -7461 bp im Murinen $p54^{nrB}$ -Gen. (orange) Promotorregion; (blau) Exon; (grün) Intron; (rot) kodierendes Exon; (gelb) *Luciferase*-Reportergen. Die Zahlen beschreiben die Position der Nukleotide relativ zum Translationsstart. Die erste Base stromaufwärts vor dem ATG Start Codon wurde als -1 bezeichnet. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart (Schmid *et al.*, 2013).

Im folgenden Abschnitt wurden die so generierten $p54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukte verwendet, um den Einfluss von MIA/CD-RAP auf die transkriptionelle Regulation des $p54^{nrb}$ -Promotors zu studieren.

3.2.2 Erste Hinweise auf die Aktivität des $p54^{nrb}$ -Promotors im malignen Melanom

Es konnte bereits eine verstärkte $p54^{nrb}$ mRNA- und Proteinexpression im malignen Melanom im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden (Schiffner *et al.*, 2011). Unter Verwendung von Luciferase-Reporter-Gen-Assays und des unter 3.2.1 beschriebenen humanen $p54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukts ($hp54^{nrb}$ Luc) sollte nun die transkriptionelle Aktivität des Promotors in verschiedenen Melanomzelllinien bestätigt werden. In Übereinstimmung mit hohen $p54^{nrb}$ mRNA- und Proteinexpressionen konnte eine starke Aktivität des humanen $p54^{nrb}$ - ($hp54^{nrb}$) Promotors in den Melanomzelllinien Mel Juso, Mel Ei, Mel Im und Mel Ju festgestellt werden (Abbildung 25 A).

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, ob die bereits beschriebene Induktion der $p54^{nrb}$ -Expression durch MIA/CD-RAP (Schiffner *et al.*, 2011) auf transkriptioneller Ebene vonstattengeht. Hierzu wurde die $p54^{nrb}$ -Promotoraktivität in den MIA/CD-RAP-negativen HMB2 Zellklonen HMB2 -MIA5 und -MIA8 (Poser *et al.*, 2004; Tatzel *et al.*, 2005) bestimmt. Als Kontrolle wurden β -Galaktosidase exprimierende HMB2 *lacZ* Zellklone verwendet. Im Vergleich zu der parentalen Zelllinie HMB2 und den Kontrollklonen HMB2 *lacZ* war die $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität in den HMB2 -MIA5 und -MIA8 Zellklonen signifikant reduziert. Zwischen HMB2 Zellen und HMB2 *lacZ* Zellklonen konnte kein signifikanter Unterschied in der $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität nachgewiesen werden (Abbildung 25 B). Diese ersten Ergebnisse deuten stark auf eine MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung des $p54^{nrb}$ -Promotors hin. Im nächsten Abschnitt sollte dieser Aspekt genauer untersucht werden.

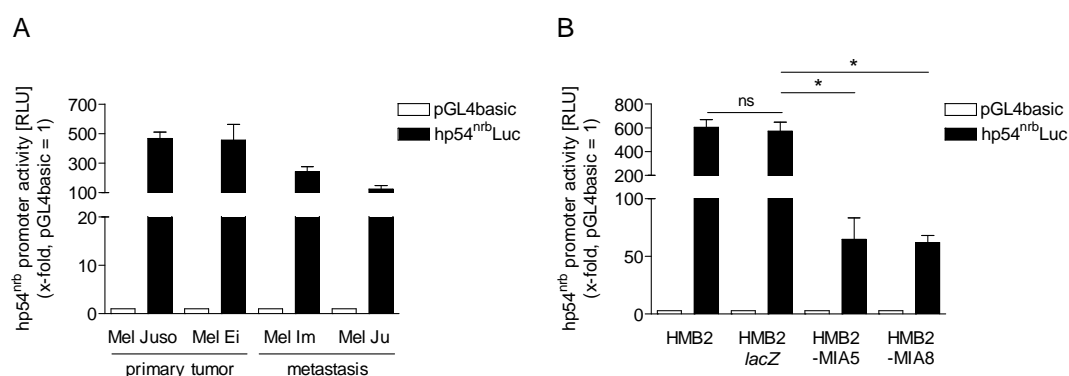


Abbildung 25: Bestimmung der $p54^{nrb}$ -Promotoraktivität im Melanom per Reporter-Gen-Assay. (A) Der humane $p54^{nrb}$ - ($hp54^{nrb}$) Promotor war in allen Melanomzelllinien stark aktiv. (B) Die $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität war in den MIA/CD-RAP negativen Zellklonen HMB2 -MIA5 und -8 im Vergleich zu der Kontrollklonen HMB2 *lacZ* signifikant verringert (*: $p < 0,05$). Es war kein signifikanter Unterschied in der $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität zwischen HMB2 und HMB2 *lacZ* feststellbar (ns: nicht signifikant) (Schiffner *et al.*, 2011).

3.2.3 Regulation der $p54^{nrb}$ -Promotorregion in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP in Mensch und Maus

Erste Hinweise auf die MIA/CD-RAP gesteuerte Verstärkung der $p54^{nrb}$ -Promotoraktivität sollte nun durch detaillierte Analysen in Luciferase-Reporter-Gen-Assays, unter Zuhilfenahme des humanen und murinen $p54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukts, bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden die eingangs beschriebenen MIA/CD-RAP-negativen Modell Systeme verwendet.

Die Herunterregulation von MIA/CD-RAP durch siRNA-Technologie in der Melanomzelllinie Mel Im führte zu einer reduzierten $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität (Abbildung 26 A). Die durchschnittliche Verminderung der MIA/CD-RAP-mRNA-Expression in Mel Im Zellen durch Transfektion mit spezifischer siRNA in allen folgenden Experimenten wurde per qRT-PCR bestätigt (Abbildung 26 B).

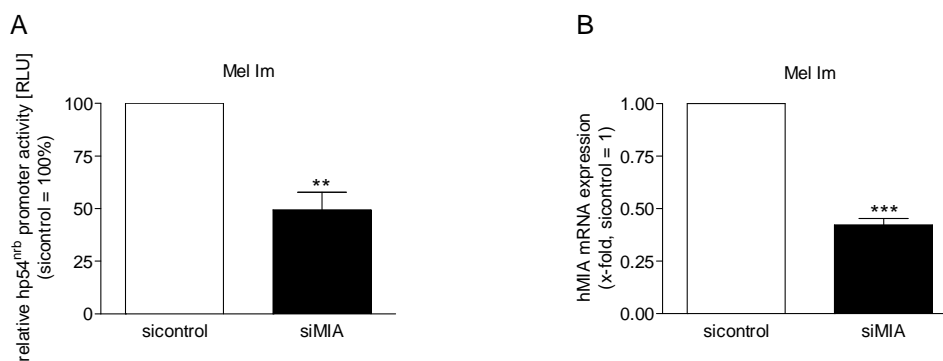


Abbildung 26: Bestimmung der $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität per Reporter-Gen-Assay. (A) Die Herunterregulation der MIA/CD-RAP-Expression durch siRNA führte in Mel Im Zellen zu einer signifikanten Verminderung der relativen $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen (**: $p < 0,01$). (B) Die durchschnittliche Herunterregulation der MIA/CD-RAP-Expression per siRNA-Technologie in Mel Im Zellen, wurde durch qRT-PCR analysiert. Die MIA/CD-RAP-mRNA-Expression wurde in allen Experimenten nach Transfektion mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA im Vergleich zu Kontrolle signifikant reduziert (***: $p < 0,001$) (Schmid *et al.*, 2013).

Die transkriptionelle Aktivität des $p54^{nrb}$ -Promotors wurde außerdem in differenzierten murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) isoliert aus Wildtyp- (WT) und MIA-*knockout*- (MIA-/-) Mäusen unter Verwendung des unter 3.2.1 dargestellten murinen $p54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukts ($mp54^{nrb}$ Luc) kontrolliert. Die Differenzierung wurde dabei mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. In WT-mMSC konnte ebenfalls eine starke Aktivität des murinen $p54^{nrb}$ - ($mp54^{nrb}$) Promotors gezeigt werden (Abbildung 27 A), was auf eine transkriptionelle Regulation des $p54^{nrb}$ -Gens in der Chondrogenese schließen lässt. In MIA-/- mMSC war die $mp54^{nrb}$ -Promotoraktivität im Vergleich zu WT-mMSC deutlich reduziert (Abbildung 27 A). Experimente in denen die MIA/CD-RAP-Expression per siRNA in WT-mMSC vermindert wurde bestätigten die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung des $p54^{nrb}$ -Promotors (Abbildung 27°B). Die durchschnittliche Verminderung der MIA/CD-RAP-mRNA-Expression in WT-mMSC, per siRNA-

Technologie, in allen folgenden Experimenten wurde per qRT-PCR kontrolliert (Abbildung 27 C).

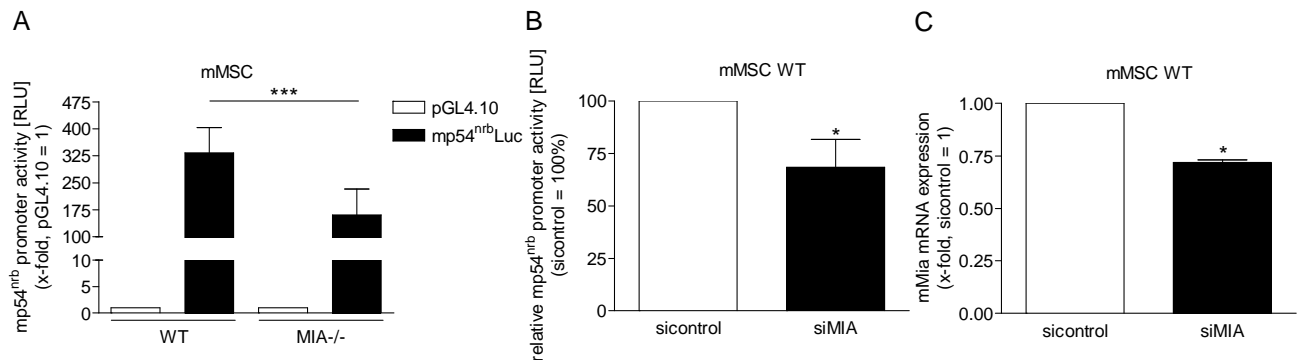


Abbildung 27: Bestimmung der $mp54^{nrp}$ -Promotoraktivität per Reporter-Gen-Assay. Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert. **(A)** Der murine $p54^{nrp}$ - ($mp54^{nrp}$) Promotor war in murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) isoliert aus Wildtyp- (WT) Mäusen stark aktiv. Im Vergleich dazu war die Promotoraktivität in mMSC aus MIA-knockout- (MIA^{-/-}) Mäusen signifikant vermindert (***: $p < 0,001$). **(B)** WT-mMSC transfiziert mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA wiesen eine signifikant verminderte relative $mp54^{nrp}$ -Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle auf (*: $p < 0,05$). **(C)** Die Effizienz des Einsatzes von siRNA zur Verminderung der MIA/CD-RAP-Expression wurde per qRT-PCR validiert. Die MIA/CD-RAP-mRNA-Expression wurde nach Transfektion mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA im Vergleich zur Kontrolle signifikant inhibiert (*: $p < 0,05$) (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Um die in der *in silico* Analyse gezeigten Konservierung des $p54^{nrp}$ -Promotors zwischen Mensch und Maus aus Abschnitt 3.2.1 zu bestätigen, wurde die Aktivität des $hp54^{nrp}$ -Promotor-Reporterkonstrukts in murinen MSC bzw. die Aktivität des $mp54^{nrp}$ -Promotor-Reporterkonstrukts in humanen HMB2 Zellen untersucht. Der $hp54^{nrp}$ -Promotor zeigte auch in mMSC eine starke Aktivität, welche in MIA^{-/-} mMSC merklich vermindert war (Abbildung 28 A). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte die Aktivität des $mp54^{nrp}$ -Promotors in HMB2 Zellen gezeigt werden, dessen Aktivität in HMB2 -MIA5 Zellklonen stark reduziert war (Abbildung 28 B).

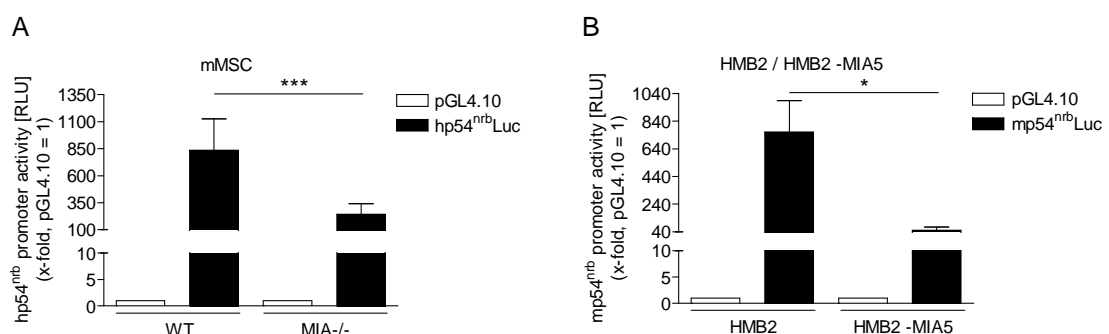


Abbildung 28: Analyse der Konservierung des $p54^{nrp}$ -Promotors per Reporter-Gen-Assay. **(A)** Der $hp54^{nrp}$ -Promotor zeigte eine starke Aktivität in WT-mMSC, wobei diese in MIA^{-/-} mMSC signifikant reduziert war (***: $p < 0,001$) (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). **(B)** Die $mp54^{nrp}$ -Promotoraktivität war in HMB2 -MIA5 im Vergleich zu HMB2 Zellen signifikant reduziert (*: $p < 0,05$) (Schmid *et al.*, 2013).

Es wurde somit eine starke Konservierung des humanen und murinen $p54^{nrb}$ -Promotors bestätigt. Beide Konstrukte waren in murinen und humanen Zellsystemen funktionell aktiv und ihre Aktivität war durch MIA/CD-RAP positiv moduliert.

3.2.4 Identifizierung der exakten $p54^{nrb}$ -Promotorregion, welche die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung vermittelt

Zur Aufklärung des Mechanismus mit dem MIA/CD-RAP die $p54^{nrb}$ -Promotoraktivität erhöht, wurde eine Serie von verkürzten $hp54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukten unter Zuhilfenahme der *nested deletion* Methode (siehe 5.3.3.8) angefertigt. Die erhaltenen Reporterkonstrukte wurden in HMB2 Zellen und in die MIA/CD-RAP-negativen Zellklone HMB2 -MIA5 transfiziert und die Promotoraktivität per Luciferase-Reporter-Gen-Assay bestimmt. Für dieses Screening wurde zunächst nur das HMB2 Modellsystem verwendet, da sich hier die nötigen hohen Zellzahlen realisieren ließen. In Abbildung 29 ist eine schematische Übersicht der zunächst verwendeten Promotor-Reporterkonstrukte (A), sowie die resultierenden Promotoraktivitäten nach Transfektion in HMB2 Zellen und HMB2 -MIA5 Zellklonen dargestellt (B). Die Experimente zeigten, dass das 336 bp lange Fragment des $hp54^{nrb}$ -Promotors zwischen -7300 und -6964 bp relativ zum Translationsstart den aktivierenden Effekt von MIA/CD-RAP vermittelt. Die Ratio der Promotoraktivität in HMB2 Zellen und HMB2 -MIA5 Zellklonen war auf 1 reduziert, verglich man die Aktivität des Konstrukts dem dieser Bereich fehlt mit dem, der diesen Bereich noch enthielt (Abbildung 29 C).

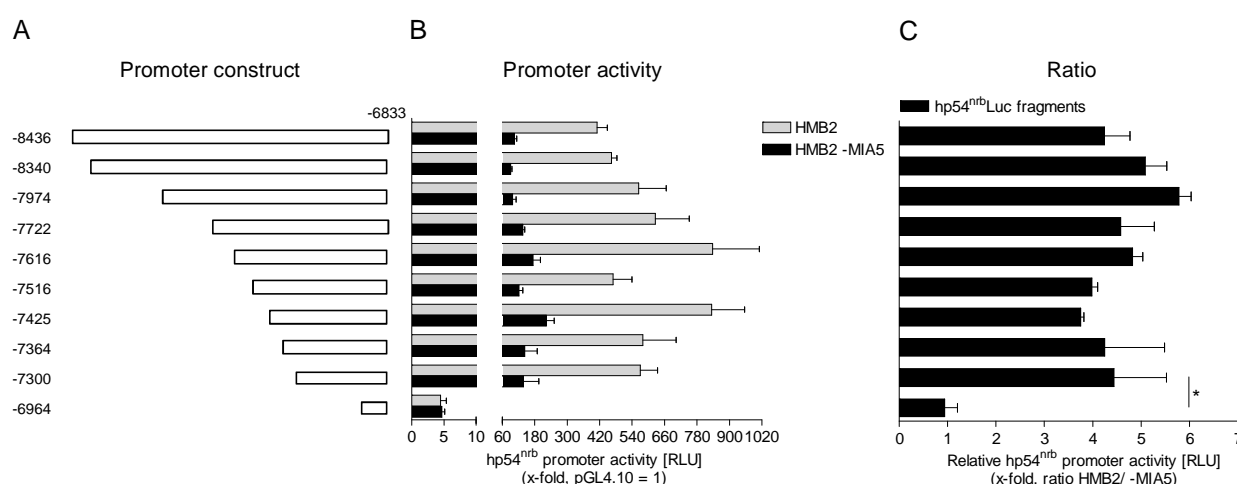


Abbildung 29: Grobe Eingrenzung der $p54^{nrb}$ -Promotorregion, welche die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung steuert. (A) Schematische Darstellung der transfizierten $hp54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukte, generiert per *nested deletion*. (B) Analyse der $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität per Reporter-Gen-Assay nach transienter Transfektion des jeweiligen Promotor-Reporterkonstrukts in HMB2 (graue Balken) und HMB2 -MIA5 (schwarze Balken) Zellen. (C) Ratio der $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität zwischen HMB2 und HMB2 -MIA5 Zellen für das jeweilige Promotor-Reporterkonstrukt. Die Ratio sinkt signifikant auf 1 nach Deletion eines 336 bp langen DNA-Fragments zwischen -7300 und -6964 bp relativ zum Translationsstart des $hp54^{nrb}$ -Promotors (*: $p < 0,05$) (Schmid *et al.*, 2013).

Als nächstes folgte eine detaillierte Analyse dieser kleinen Region des *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukts zwischen -7300 und -6964 bp relativ zum Translationsstart, indem weitere verkürzte *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukte angefertigt wurden (Abbildung 30 A). Diese wurden ebenfalls in HMB2 Zellen und HMB2 -MIA5 Zellklone transfiziert und die Promotoraktivität per Luciferase-Reporter-Gen-Assay bestimmt (Abbildung 30 B). Es konnte ein 42 bp langes DNA-Fragment zwischen -7079 und -7037 bp relativ zum Translationsstart bestimmt werden, welches den Haupteffekt von MIA/CD-RAP auf die Verstärkung der *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität vermittelt. Die Ratio der Promotoraktivität war auf 1 reduziert, verglich man die Aktivität des Konstrukts ohne den Bereich zwischen -7079 und -7037 bp mit dem, der diesen Bereich noch enthält. Weitere Deletionen *stromabwärts* von -7037 bp des Promotorkonstrukts resultierten in keiner Veränderung der Ratio (Abbildung 30 C).

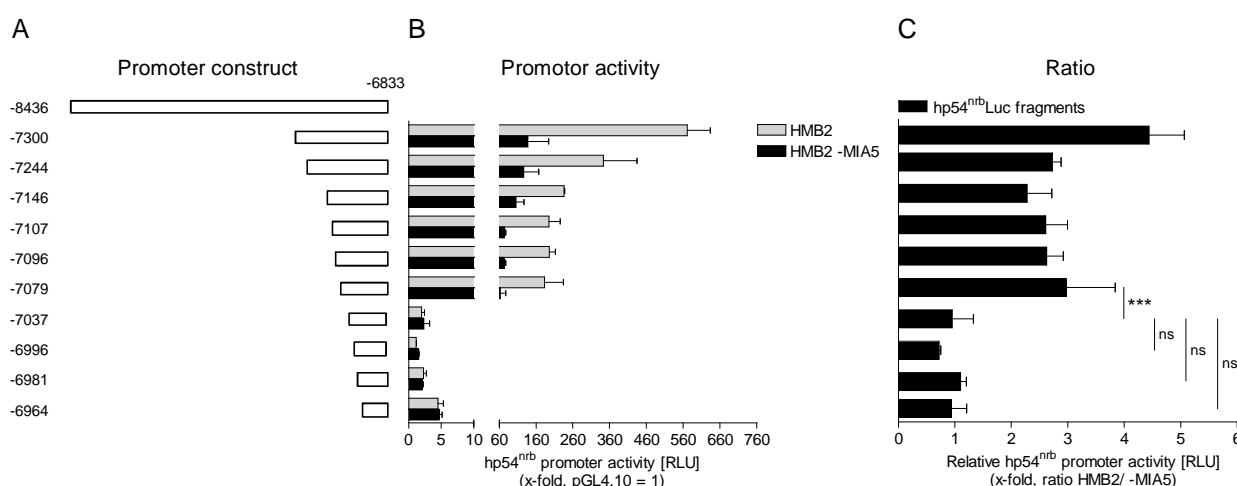


Abbildung 30: Genauere Eingrenzung der *hp54^{nrb}*-Promotorregion, welche die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung steuert. (A) Schematische Darstellung der transfizierten *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukte, generiert per *nested deletion* und Klonierung. (B) Gezeigt ist die *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität nach transienter Transfektion der jeweiligen Promotor-Reporterkonstrukte in HMB2 (graue Balken) und HMB2 -MIA5 (schwarze Balken) Zellen, analysiert per Reporter-Gen-Assay. (C) Die Ratio der *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität zwischen HMB2 und HMB2 -MIA5 Zellen sank signifikant auf 1 nach Deletion eines 42 bp langen DNA-Fragments zwischen -7079 und -7037 bp relativ zum Translationsstart des *hp54^{nrb}*-Promotors (***: $p < 0,001$). Eine weitere Deletion des Promotors zwischen -7037 und -6964 bp führte zu keiner signifikanten Änderung der Ratio (ns: nicht signifikant) (Schmid *et al.*, 2013).

Um die Relevanz dieses Promotorabschnittes für die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung der *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität zu bestätigen, wurden ausgewählte *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukte in WT- und MIA-/- mMSC transfiziert (Abbildung 31 A). Die Promotoraktivität wurde per Luciferase-Reporter-Gen-Assay bestimmt (Abbildung 31 B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem humanen Zellsystem war die Promotorregion zwischen -7079 und -7037 bp auch im murinen System für MIA/CD-RAP erforderlich, um die *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität zu erhöhen (Abbildung 31 C).

Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem 42 bp langen DNA Stück zwischen -7079 und -7037 bp des *p54^{nrb}*-Promotors um einen hoch konservierten Bereich handelt, der die MIA/CD-RAP induzierte *p54^{nrb}*-Gentranskription reguliert.

Inkubation des 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotids mit Kernprotein aus HMB2 Zellen, konnten zwei DNA-Protein-Komplexe nachgewiesen werden (Abbildung 33 A: Spur 3). Diese Bindung von Proteinen an das 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid war deutlich schwächer bei Inkubation mit Kernprotein aus HMB2 -MIA5 Zellklonen (Abbildung 33 A: Spur 4). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte die Inkubation von Kernprotein aus WT-mMSC zur Bildung von zwei DNA-Protein-Komplexen (Abbildung 33 B: Spur 3), welche bei Inkubation mit Kernprotein aus MIA-/- mMSC schwächer waren (Abbildung 33 B: Spur 4). Wie erwartet konnte bei der Untersuchung von Proteinbindungen an das 3'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid keine MIA/CD-RAP Abhängigkeit, weder im humanen noch im murinen System, nachgewiesen werden (Abbildung 33 A und B: Spur 5 und 6).

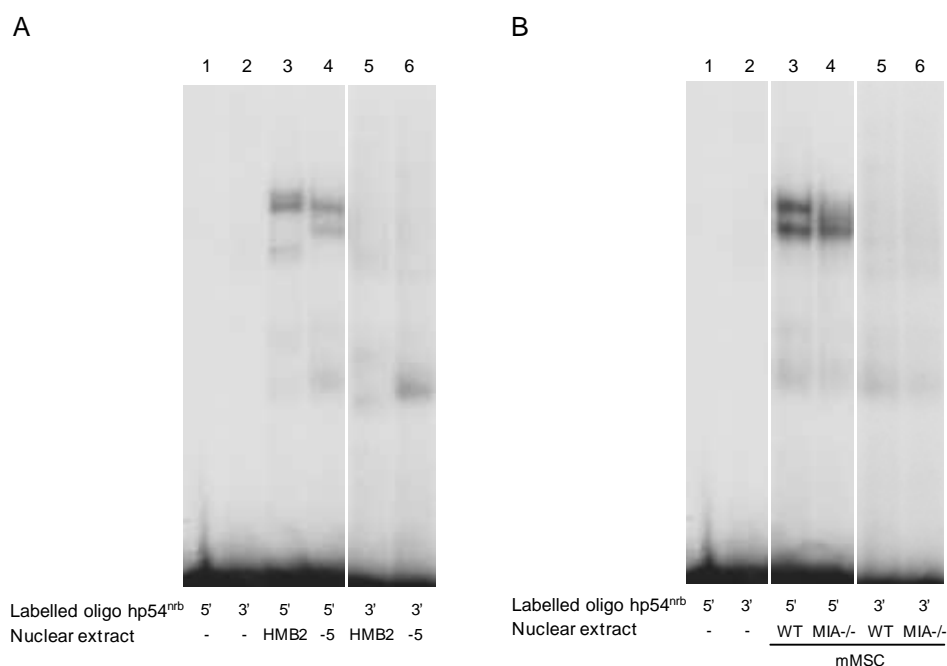


Abbildung 33: Analyse der MIA/CD-RAP-abhängigen Bindung von Transkriptionsfaktoren an den *hp54^{nrb}*-Promotor per Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA). (A) Bei Inkubation des 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotids mit Kernprotein aus HMB2 Zellen konnten zwei DNA-Protein-Komplexe nachgewiesen werden (Spur 3). Kernprotein aus HMB2 -MIA5 Zellklonen zeigten eine verminderte Bindung an das 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid (Spur 4). Es konnte keine MIA/CD-RAP-abhängige Interaktion von Kernproteinen mit dem 3'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid (Spur 5 und 6) nachgewiesen werden (Schmid *et al.*, 2013). (B) Die Inkubation des 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotids mit Kernprotein aus WT-mMSC (Spur 3) ergab zwei DNA-Protein-Komplexe, welche bei Inkubation mit Kernprotein aus MIA-/- mMSC (Spur 4) schwächer wurden. Es konnte keine MIA/CD-RAP-abhängige Interaktion von Kernproteinen mit dem 3'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid (Spur 5 und 6) nachgewiesen werden (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Der Inhalt der Reaktionsansätze ist schematisch unter den Gelbildern dargestellt. Als Kontrolle sind in Spur 1 und 2 die markierten Oligonukleotide ohne Kernprotein aufgetragen.

Um nun die genaue MIA/CD-RAP-spezifische regulatorische Stelle im genomischen Bereich von -7079 bis -7062 bp des *hp54^{nrb}*-Promotors zu definieren, wurden mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen mit Hilfe des *MatInspector*-Programms (www.genomatix.de) ermittelt. Die Analyse dieser Region ergab zwei potentielle Bindestellen für mehrere Transkriptionsfaktoren im Bereich von -7075 bis -7070 bp relativ zum Translationsstart des

hp54^{nrb}-Gens. Um zunächst die Relevanz dieser Bindestellen zu untersuchen wurden zwei doppelsträngige Oligonukleotide generiert, die dem 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid entsprachen, jedoch die erste (5'-*hp54^{nrb}* Mut I) oder die zweite (5'-*hp54^{nrb}* Mut II) Bindestelle mutiert war (Abbildung 32). Ob weiterhin eine DNA-Protein Interaktion zustande kommt, wurde per EMSA-Analysen untersucht. Die Ausbildung von zwei starken DNA-Protein-Komplexen nach Inkubation von Kernprotein aus HMB2 (A: Spur 1) und WT-mMSC (B: Spur 4) mit dem 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid konnte bestätigt werden (Abbildung 34). Diese Interaktion war nach Inkubation von Kernprotein aus HMB2 -MIA5 Zellklonen (A: Spur 4) und MIA-/- mMSC (B: Spur 7) deutlich reduziert (Abbildung 34). In beiden Zellsystemen führte die Mutation der Transkriptionsfaktorbindestellen (5'-*hp54^{nrb}* Mut I und -II) zu einer fast kompletten Aufhebung der DNA-Protein Interaktion (Abbildung 34 A: Spur 2, 3 und 5, 6; B: Spur 5, 6 und 8, 9).

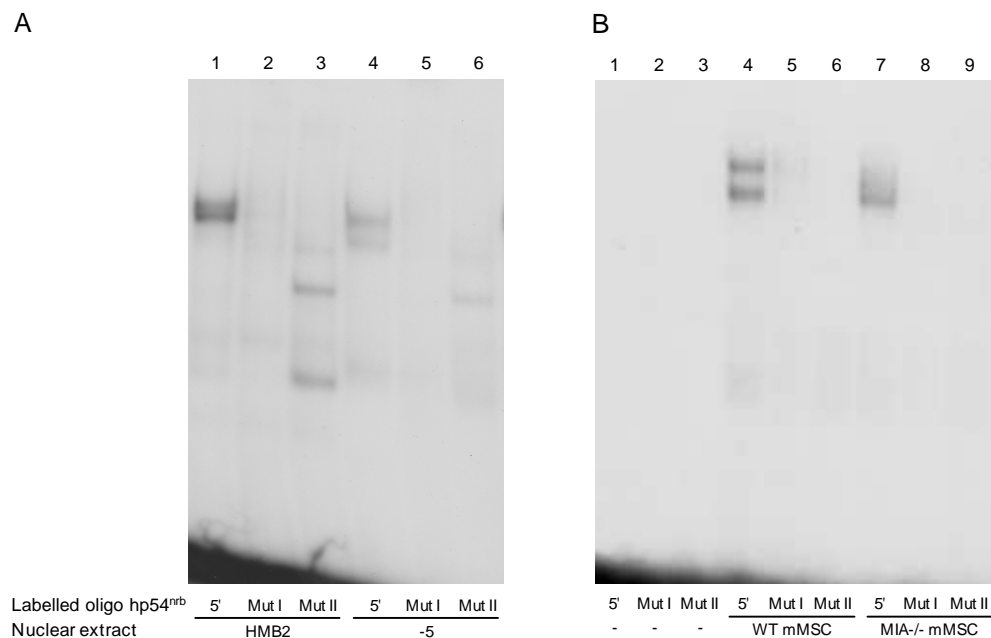


Abbildung 34: Genaue Eingrenzung der MIA/CD-RAP-abhängigen regulatorischen Stelle im *hp54^{nrb}*-Promotor per Mutagenese und Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay. (A) Die Inkubation von Kernprotein aus HMB2 Zellen (Spur 1) mit dem 5'-*hp54^{nrb}* Oligonukleotid führte zur Bildung von 2 DNA-Protein-Komplexen, welche in Versuchen mit Kernproteinen aus HMB2 -MIA5 Zellen (Spur 4) schwächer ausgebildet waren. Die Mutation der Transkriptionsfaktorbindestellen (Mut I und II) im 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid verhinderte die Ausbildung eines MIA/CD-RAP-regulierten DNA-Protein-Komplexes in HMB2- und HMB2 -MIA5 Zellen (Spur 2, 3 und 5, 6) (Schmid *et al.*, 2013). (B) Es kam zur Ausbildung von zwei DNA-Protein-Komplexen nach Inkubation des 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotids mit Kernprotein aus WT-mMSC (Spur 4). Die Ausbildung dieser Komplexe war vermindert bei Inkubation mit Kernprotein aus MIA-/- mMSC (Spur 7). Beide Mutationen im 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid verhinderten die Ausbildung eines MIA/CD-RAP-abhängigen DNA-Protein-Komplexes in WT- und MIA-/- mMSC (Spur 5, 6 und 8, 9). Der Inhalt der Reaktionsansätze ist in schematisch unter den Gelbildern dargestellt. Als Kontrolle sind in Spur 1 bis 3 die markierten Oligonukleotide ohne Kernprotein aufgetragen (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Um diese Daten zu bestätigen, wurde für eine weitere EMSA-Analyse Kernproteine aus der Melanomzelllinie Mel Im, in denen die MIA/CD-RAP-Expression per siRNA-Technologie herunterreguliert wurde, isoliert. Die Inkubation von Kernproteinen aus unbehandelten Mel Im Zellen mit dem 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid führte zu einer Ausbildung von zwei DNA-Protein-

Komplexen (Abbildung 35 A: Spur 4). Kernprotein aus Zellen in denen die MIA/CD-RAP-Expression durch siRNA vermindert wurde (Spur 10), bildeten einen schwächeren DNA-Protein-Komplex im Vergleich zur Kontrolle (Spur 7) aus (Abbildung 35). Die Verminderung der Bindung wurde densitometrisch vermessen (Abbildung 35 B). Die Mutation der Transkriptionsfaktorbindestellen I und II verhinderte die Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes (Abbildung 35 A: Spur 5, 6; 8, 9 und 11, 12).

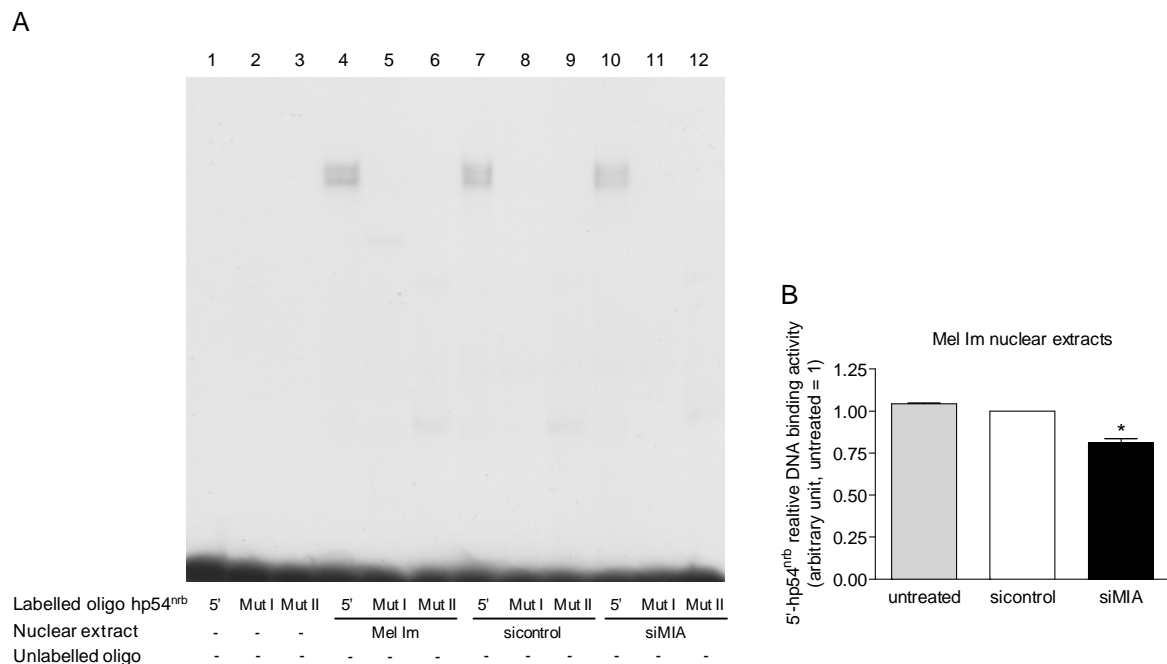


Abbildung 35: Bestätigung der MIA/CD-RAP-abhängigen regulatorischen Stelle im *hp54^{nrb}*-Promotor in Mel Im Zellen unter Einsatz von MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA. (A) Die Inkubation von Kernprotein aus der Melanomzelllinie Mel Im führte zur Ausbildung von zwei DNA-Protein-Komplexen, untersucht durch EMSA Analysen (Spur 4). Die Ausbildung des DNA-Protein-Komplexes war in Mel Im Zellen, transfiziert mit MIA/CD-RAP-spezifischer RNA (Spur 10), im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Spur 7). Die Mutation der Transkriptionsfaktorbindestellen (Mut I und II) innerhalb des 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotids verhinderte die Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes (Spur 5, 6; 8, 9 und 11, 12). (B) Densitometrische Quantifizierung der Bindung von Kernprotein aus Mel Im Zellen an das 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid analysiert per EMSA. Die Bindung war signifikant reduziert nach Inhibition der MIA/CD-RAP-Expression per siRNA-Technologie (*: $p < 0,05$). Der Inhalt der Reaktionsansätze ist schematisch unter den Gelbildern dargestellt. Als Kontrolle sind in Spur 1 bis 3 die markierten Oligonukleotide ohne Kernprotein aufgetragen (Schmid *et al.*, 2013).

Es wurden nun Verdrängungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen an unmarkierten 5'-*hp54^{nrb}*-, -Mut I- und -Mut II-Oligonukleotiden im Überschuss durchgeführt, um die spezifische Interaktion von Kernproteinen aus HMB2 und WT-mMSC an das 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid zu beweisen. Sogar kleine Mengen an unmarkierten 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid war ausreichend, um die DNA-Protein Interaktion von Kernproteinen mit dem markiertem 5'-*hp54^{nrb}*-Oligonukleotid zu verhindern (Abbildung 36 A, B: Spur 3). Zusätzlich führte nicht einmal die höchste Konzentration an unmarkierten 5'-*hp54^{nrb}* Mut I- und -Mut II-Oligonukleotid zu einer Verdrängung der DNA-Protein Interaktion (Abbildung 36 A, B: Spur 8 und 11).

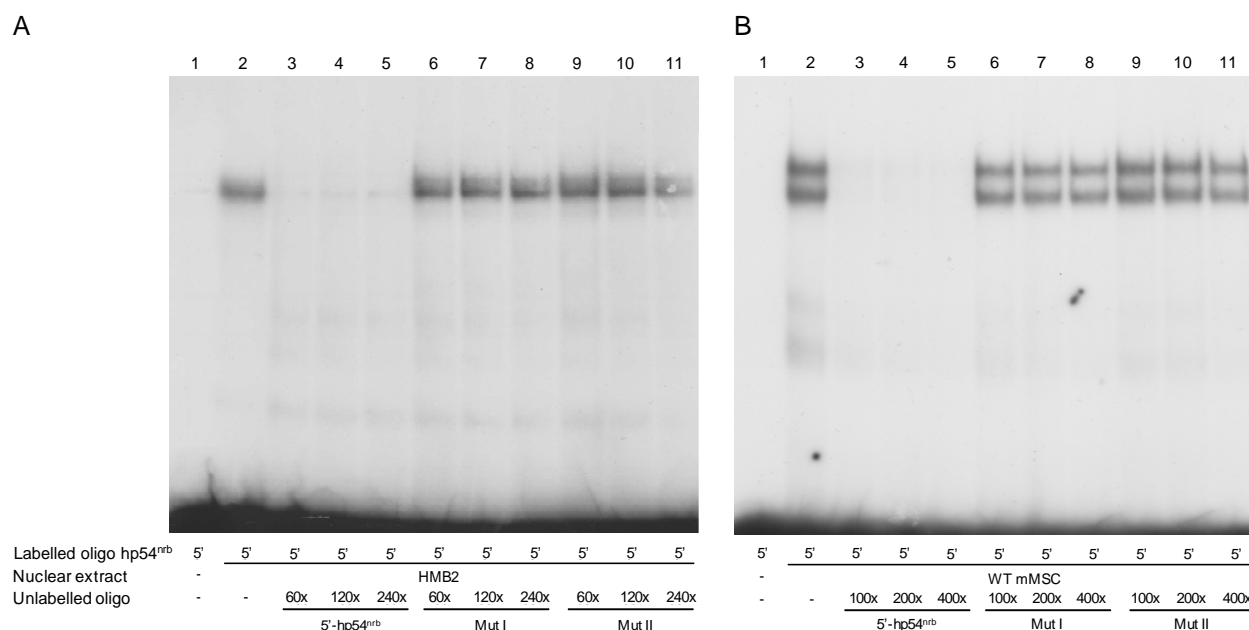


Abbildung 36: Untersuchung der Bindespezifität an den $hp54^{nrp}$ -Promotors. Für Verdrängungsexperimente wurden EMSA-Analysen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an unmarkierten 5'- $hp54^{nrp}$ -Oligonukleotiden (Spur 3 bis 5) bzw. mutierten Oligonukleotiden Mut I und II (Spur 6 bis 8 und Spur 9 bis 11) durchgeführt. Die Vorinkubation von unmarkiertem 5'- $hp54^{nrp}$ -Oligonukleotiden mit Kernprotein aus HMB2 (**A**) und WT-mMSC (**B**) (Spur 3 bis 5) führte zu einer Verdrängung der DNA-Protein-Interaktion, welche sich bei Inkubation von Kernprotein mit dem markiertem 5'- $hp54^{nrp}$ -Oligonukleotid bildete (Spur 2). Die Inkubation mit unmarkiertem mutiertem 5'- $hp54^{nrp}$ -Oligonukleotiden führte zu keiner Verdrängung der DNA-Protein Interaktion, weder bei Kernproteinen aus HMB2 (**A**) noch aus WT-mMSC (**B**) (Spur 6 bis 8 und Spur 9 bis 11). Der Inhalt der Reaktionsansätze ist schematisch unter den Gelbildern dargestellt. Als Kontrolle ist jeweils in Spur 1 das markierte Oligonukleotide ohne Kernprotein aufgetragen (**A**: Schmid *et al.*, 2013; **B**: Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Als nächstes wurde die Auswirkung der beiden Mutationen (Mut I und II) im Bereich von -7075 bis -7070 bp des -7079 bis -6833 bp langen $hp54^{nrp}$ -Promotor-Reporterkonstrukts auf die Promotoraktivität per Luciferase-Reporter-Gen-Assay untersucht. Die Transfektion der mutierten Formen des $hp54^{nrp}$ -Promotor-Reporterkonstrukts in HMB2 Zellen und HMB2 -MIA5 Zellklone zeigte, dass beide Mutationen zu einem annähernd kompletten Verlust der MIA/CD-RAP-abhängigen Aktivierung des $p54^{nrp}$ -Promotors führte. Es war hier die Ratio der Promotoraktivitäten auf 1 reduziert beim Vergleich der Aktivität der mutierten Konstrukte mit der Aktivität des unmutierten Konstrukts (Abbildung 37 A, rechts). Die Ratio entsprach somit der nach Transfektion des Konstrukts ohne den MIA/CD-RAP regulatorischen Bereich zwischen -7079 und -7037 bp. Auch in Mel Im Zellen, in denen die MIA/CD-RAP-Expression per siRNA herunterreguliert wurde, kam es zu einer beinahe Aufhebung der MIA/CD-RAP gesteuerten Verstärkung der $p54^{nrp}$ -Transkription (Abbildung 37 B). Die Transfektion der mutierten Konstrukte in mMSC hob die MIA/CD-RAP vermittelte Aktivierung der $p54^{nrp}$ -Promotoraktivität auf (Abbildung 37 C).

Die Region von -7075 bis -7070 bp relativ zum Translationsstart des $hp54^{nrp}$ -Promotors ist somit für die MIA/CD-RAP-abhängige Verstärkung der $p54^{nrp}$ -Promotoraktivität verantwortlich.

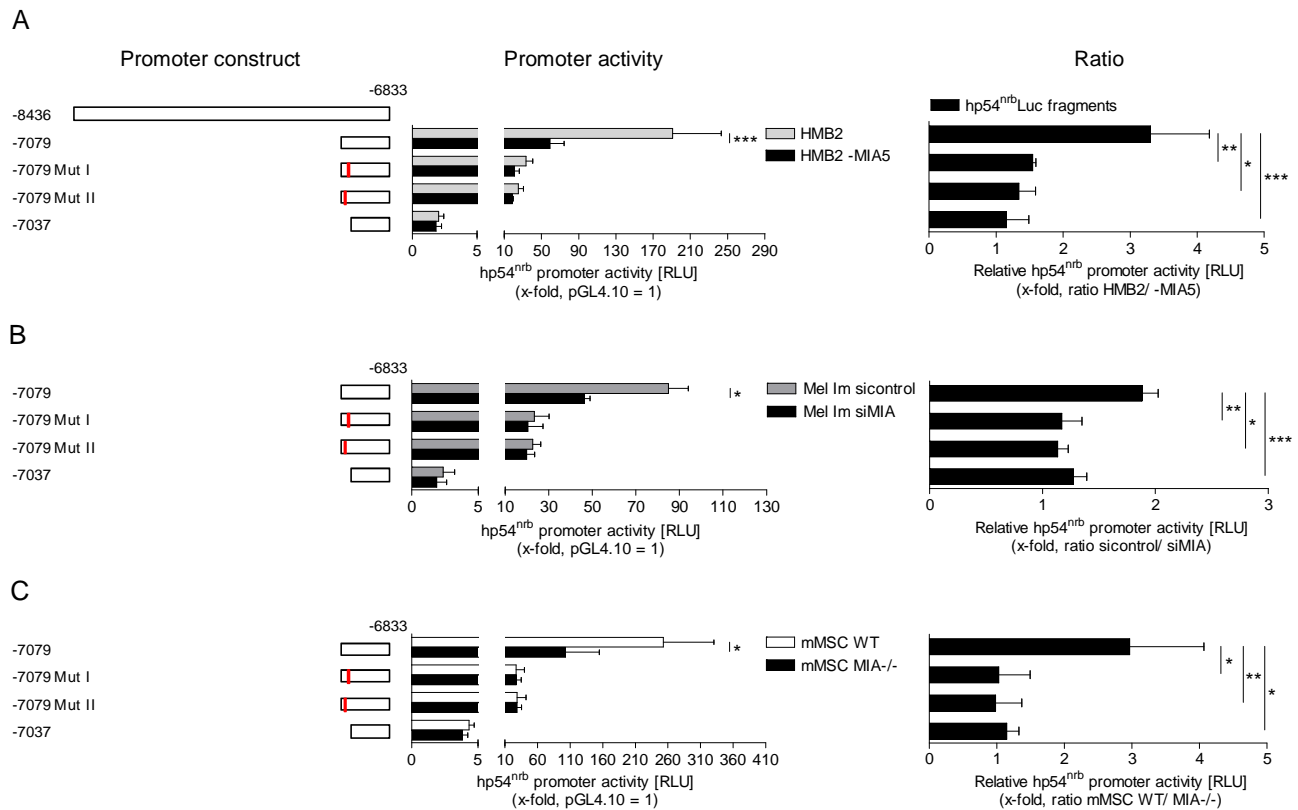


Abbildung 37: Einfluss der Mutation von möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen auf die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung der $p54^{nrb}$ -Transkription. Links sind die transfizierten $hp54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukte dargestellt. Die rote Markierung repräsentiert mutierte Stellen im Promotor-Reporterkonstrukt. In der Mitte ist die $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität, untersucht per Reporteragen-Assay, nach transients Transfektion des jeweiligen Promotor-Reporterkonstrukts in die angegebenen Zellen dargestellt. Rechts ist die Ratio der Aktivität des jeweiligen $hp54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukts zwischen HMB2 und HMB2 -MIA5 Zellen (A), Mel Im siKontrolle- und siMIA-transfizierten Zellen (B) und WT- und MIA-/- mMSC (C) dargestellt. Die Aktivität des $hp54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukts von -7079 bis -6833 relativ zum Translationsstart war in allen MIA/CD-RAP-negativen Zellsystemen signifikant reduziert (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$). Die Mutation der Bindestelle I und II im $hp54^{nrb}$ -Promotor führte zu einer Aufhebung der MIA/CD-RAP-vermittelten Aktivierung der $p54^{nrb}$ -Promotoraktivität in allen drei Zellsystemen. Die Ratio der $hp54^{nrb}$ -Promotoraktivität zwischen MIA/CD-RAP-positiven und -negativen Zellen sank in allen Fällen signifikant auf 1 nach Mutation der Bindestelle I und II sowie nach Deletion des Promotorbereichs zwischen -7079 und -7037 bp (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) (A und B: Schmid *et al.*, 2013; C: Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

3.2.6 Identifizierung des Transkriptionsfaktors, welcher den $p54^{nrb}$ -Promotor in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP aktiviert

Um nun den Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der den MIA/CD-RAP aktivierenden Effekt auf den $p54^{nrb}$ -Promotor vermittelt, wurden die in der *MatInspector*-Analyse erhaltenen Faktoren genauer untersucht. Es wurden mögliche Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NFI (nuclear factor I), PBX1 (pre-B-cell leukemia homeobox 1), MEIS1 (meis homeobox 1), CEBPG (CCAAT/enhancer binding protein gamma) und HOXC5 (homeobox C5) in der Region von -7075 bis -7070 bp des $hp54^{nrb}$ -Promotors festgestellt. Die mRNA-Expression dieser Transkriptionsfaktoren wurde in HMB2 Zellen und HMB2 -MIA5 Zellklonen, in Mel Im siKontrolle- und siMIA-transfizierten Zellen und in WT- und MIA-/- mMSC per qRT-PCR bestimmt. In keinem

der drei MIA/CD-RAP-negativen Zellsysteme konnte eine einheitliche Inhibition der mRNA-Expression durch den Verlust von MIA/CD-RAP gezeigt werden (Abbildung 38).

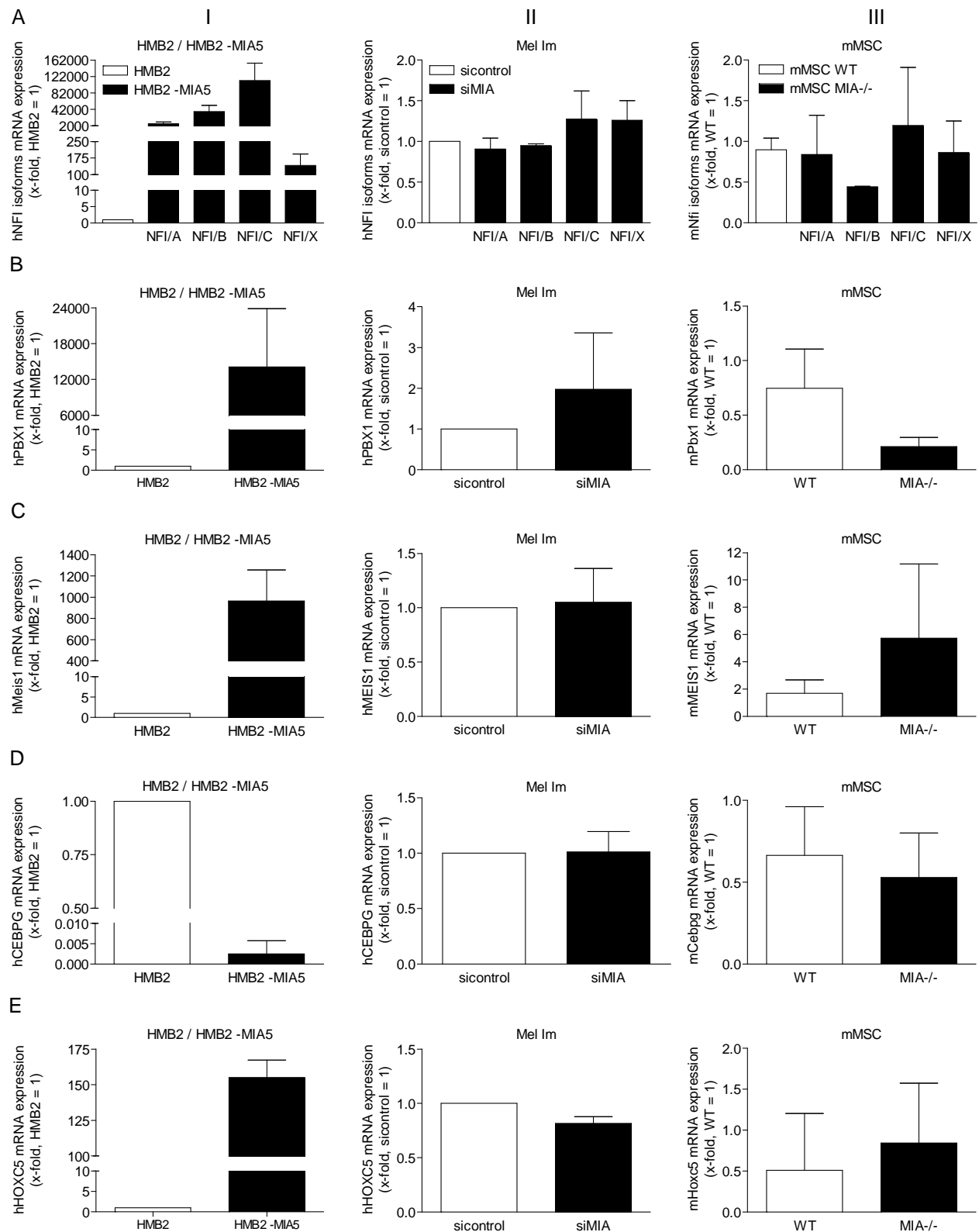


Abbildung 38: Analyse der mRNA-Expression von möglichen Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR, die den MIA/CD-RP-aktivierenden Effekt auf den $p54^{nrb}$ -Promotor vermitteln. Es konnte keine einheitliche Verminderung der mRNA-Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren (A-E) durch den Verlust von MIA/CD-RAP festgestellt werden. Es wurde die Expression in HMB2 und HMB2 -MIA5 Zellen (I), in Mel Im siKontroll- und siMIA-transfizierten Zellen (II) und in WT- und MIA-/- mMSC untersucht (III). Es wurde eine WT-mMSC-Charge gleich 1 gesetzt. (I und II: Schmid *et al.*, 2013; III: unveröffentlichte Daten).

3.2.7 YBX1 als Mediator der MIA/CD-RAP-abhängigen Aktivierung des $p54^{nrb}$ -Promotors

Als Letzt möglichen Transkriptionsfaktor, der für die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung des $p54^{nrb}$ -Promotors in Frage kam, wurde Y box binding protein 1 (YBX1) untersucht. Es wurde zunächst die Regulation der YBX1-Promotoraktivität durch MIA/CD-RAP per Luciferase-Reporter-Gen-Assays unter Verwendung eines YBX1-Promotor-Reporterkonstrukts (YBX1Luc) (Holm *et al.*, 2002) untersucht. Die YBX1-Promotoraktivität war in HMB2 -MIA5 Zellklonen im Vergleich zu HMB2 Zellen deutlich reduziert (Abbildung 39 A). Verminderte man die MIA/CD-RAP-Expression per spezifischer siRNA in Mel Im Zellen, konnte man ebenfalls eine verminderte YBX1-Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle feststellen (Abbildung 39 B). In MIA^{-/-} mMSC konnte ebenfalls eine geringere YBX1-Promotoraktivität verglichen mit WT-mMSC gezeigt werden (Abbildung 39 C).

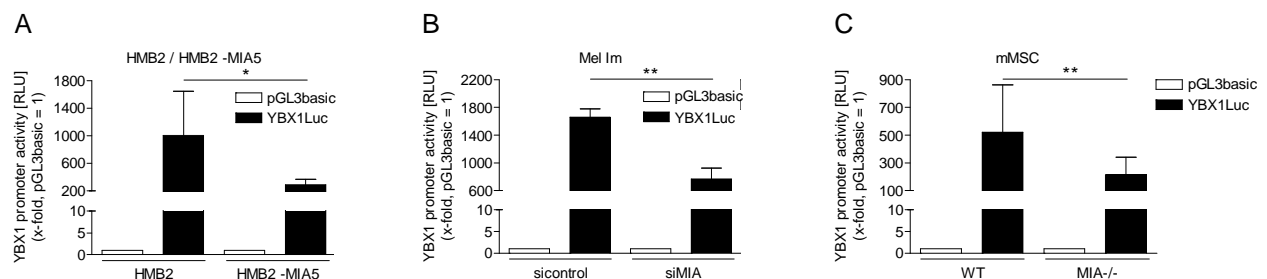


Abbildung 39: Einfluss von MIA/CD-RAP auf die YBX1-Promotoraktivität bestimmt per Reporter-Gen-Assays. (A) In HMB2 -MIA5 Zellen war die YBX1-Promotoraktivität im Vergleich zu HMB2 Zellen signifikant vermindert (*: $p < 0,05$). (B) Mel Im Zellen transfiziert mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA zeigten eine signifikant verminderte YBX1-Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolle (**: $p < 0,01$) (Schmid *et al.*, 2013). (C) Die YBX1-Promotoraktivität war in MIA^{-/-} mMSC im Vergleich zu WT-mMSC signifikant reduziert (**: $p < 0,01$) (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert.

Es ist bekannt, dass die YBX1-Aktivität im Mammakarzinom über Phosphorylierung gesteuert ist (Sutherland *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor YBX1 an der Krebsentstehung vor allem an der Entstehung von Melanomen beteiligt ist (Schitteck *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Sinnberg *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die transkriptionelle YBX1-Aktivität durch MIA/CD-RAP reguliert werden kann. Hierzu wurden weitere Luciferase-Reporter-Gen-Assays unter Zuhilfenahme eines YBX1-Reporterkonstrukts, welches vier hintereinander liegende Y-box-Konsensus-DNA-Bindestellen enthält (YBX1Luc II) (Higashi *et al.*, 2003), durchgeführt. Die YBX1-Aktivität war in HMB2 -MIA5 Zellklonen im Vergleich zu HMB2 Zellen (Abbildung 40 A), in Mel Im Zellen transfiziert mit MIA/CD-RAP siRNA im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 40 B) und in MIA^{-/-} mMSC im Vergleich zu WT-mMSC (Abbildung 40 C) reduziert.

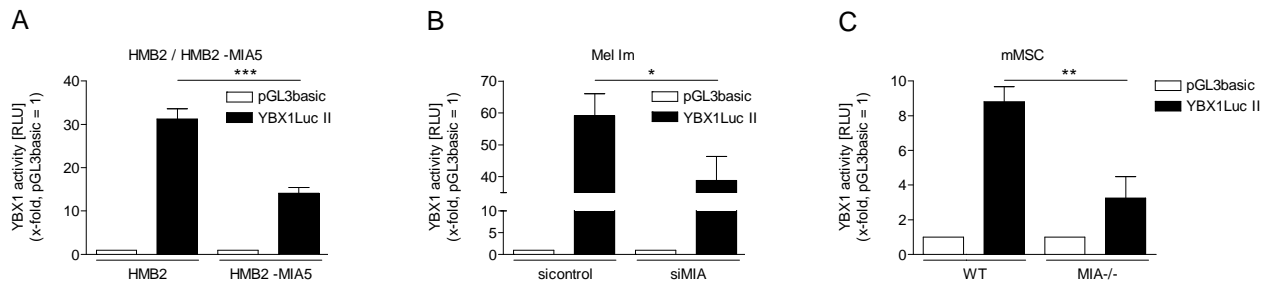


Abbildung 40: Einfluss von MIA/CD-RAP auf die YBX1-Aktivität bestimmt per Reporter-Gen-Assays. (A) Die YBX1-Aktivität war in HMB2-MIA5 Zellen im Vergleich zu HMB2 Zellen signifikant reduziert (***: p<0,001). (B) Mel Im Zellen in denen die MIA/CD-RAP-Expression per siRNA-Technologie vermindert wurde, zeigten eine signifikant verminderte YBX1-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (*: p<0,05) (Schmid *et al.*, 2013). (C) Die YBX1-Aktivität war in MIA-/- mMSC im Vergleich zu WT-mMSC signifikant reduziert (**: p<0,01). Die Differenzierung wurde mit 10 ng/ml TGF- β 3 induziert (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Diese Ergebnisse deuten auf eine YBX1-Regulation über dessen Aktivität hin. Die Phosphorylierung von YBX1 an Serin 102 (S102) ist nötig für dessen transkriptionelle Aktivität im Mammakarzinom (Sutherland *et al.*, 2005). Es wurde darum die Menge an S102-phosphoryliertem YBX1 in HMB2 Zellen und HMB2 -MIA5/8 Zellklonen (Abbildung 41 A) und in einer Reihe von WT- und MIA-/- mMSC per Western-Blot analysiert (Abbildung 41 B). Die p54^{nrb}-Proteinexpression diente als Kontrolle. Einher mit verminderter p54^{nrb}-Proteinexpression war die Menge an S102-phosphoryliertem YBX1 in den MIA/CD-RAP-negativen HMB2 Zellklonen im Vergleich zu HMB2 *lacZ* Zellklonen reduziert (Abbildung 41 A). Die basale YBX1-Proteinexpression war unverändert in diesen Zellen (Abbildung 41 A). In MIA-/- mMSC konnten ebenfalls verminderte Mengen an S102-phosphoryliertem YBX1-Protein zusammen mit verminderten Mengen an p54^{nrb} Protein im Vergleich zu WT-mMSC nachgewiesen werden (Abbildung 41 B).

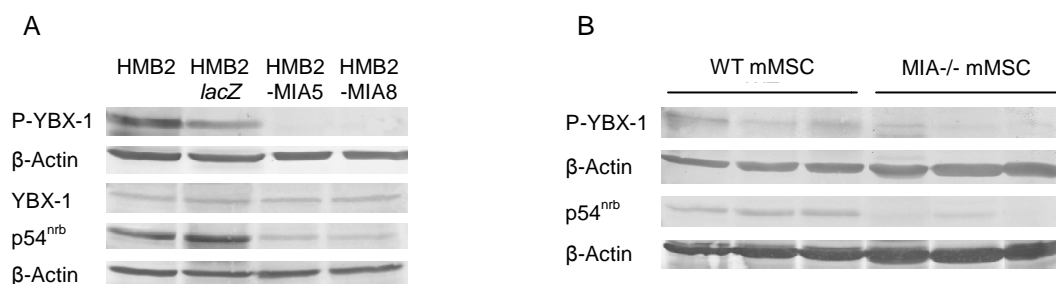


Abbildung 41: Analyse der Phosphorylierung von YBX1 an Serin 102 mittels Western Blot in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP. Die Proteinexpression von Serin 102 phosphoryliertem YBX1, YBX1 und p54^{nrb} wurde per Western Blot analysiert. Der Nachweis der β -Aktin-Proteinexpression diente als Ladekontrolle. (A) Zusammen mit verringerten p54^{nrb}-Proteinmengen, war die Menge an Serin 102 phosphoryliertem YBX1 in HMB2 -MIA5 und -MIA8 Zellen im Vergleich zu HMB2 *lacZ* Zellen erheblich reduziert. Die basale YBX1-Proteinexpression war in den untersuchten Zell unverändert (Schmid *et al.*, 2013). (B) Die Menge an Serin 102 phosphoryliertem YBX1 und p54^{nrb} war in MIA-/- mMSC im Vergleich zu WT-mMSC ebenso reduziert (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Der direkte Einfluss von YBX1 auf die *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität wurde in Luciferase-Reporter-Gen-Assays untersucht, in denen die YBX1-Expression durch siRNA-Technologie vermindert wurde. Es wurde die Regulation des längsten (-8436 bis -6833 bp) und des

kürzesten (-7079 bis -6833 bp) *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukt, welche noch die YBX1-Bindestelle enthalten, analysiert. Die Inhibition der YBX1-Aktivität führte zu einer Verminderung der *hp54^{nrb}*-Promotoraktivität in HMB2- und Mel Im Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 42 A). Die durchschnittliche Verminderung der YBX1-mRNA-Expression in HMB2- und Mel Im Zellen durch den Einsatz von siRNA-Technologie wurde per qRT-PCR kontrolliert (Abbildung 42 B).

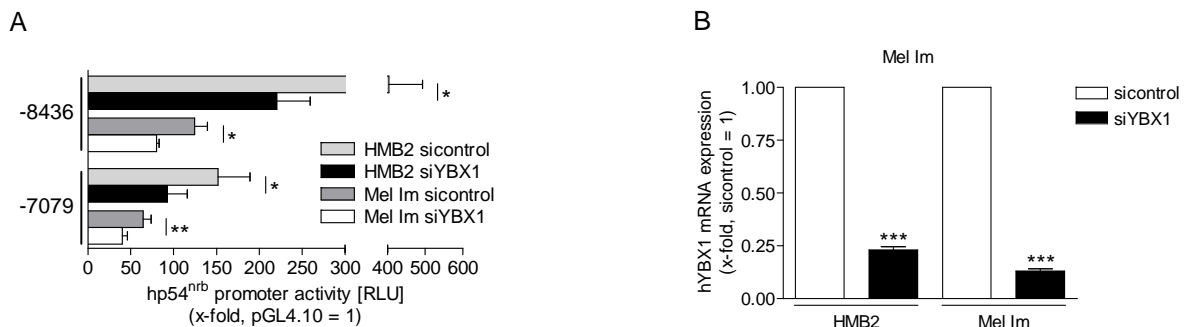


Abbildung 42: Der Einfluss von YBX1 auf die *p54^{nrb}*-Promotoraktivität analysiert per Reporteragen-Assay. (A) Das längste (-8436 bis -6833 bp) und das kürzeste (-7079 bis -6833 bp) MIA/CD-RAP-regulierte *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukt, wurde in HMB2 und Mel Im Zellen transfiziert in denen die YBX1-Aktivität per siRNA inhibiert wurde. Die *p54^{nrb}*-Promotoraktivität war in siYBX1 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). (B) Die durchschnittliche Verminderung der YBX1-Expression durch den Einsatz von spezifischer siRNA wurde per qRT-PCR analysiert. Die YBX1-mRNA-Expression wurde in HMB2- und Mel Im Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (***: $p < 0,001$) (Schmid *et al.*, 2013).

Um die direkte Bindung von YBX1 an die YBX1-Bindestelle im *p54^{nrb}*-Promotor zu zeigen, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Es wurde hierfür Chromatin aus HMB2 und Mel Im Zellen, sowie HMB2 -MIA5 Zellklonen isoliert, mit einem YBX1-spezifischen Antikörper präzipitiert und die Bindung per qRT-PCR nachgewiesen. Es konnte eine Bindung von YBX1 an den Bereich von -7180 bis -6990 bp relative zum Translationsstart des *p54^{nrb}*-Promotors, der die untersuchte YBX1-Bindestelle enthält, in HMB2 und Mel Im Zellen gezeigt werden (Abbildung 43, Spur 5). Diese Bindung war in HMB2 -MIA5 Zellklonen aufgehoben (Abbildung 43, Spur 5).

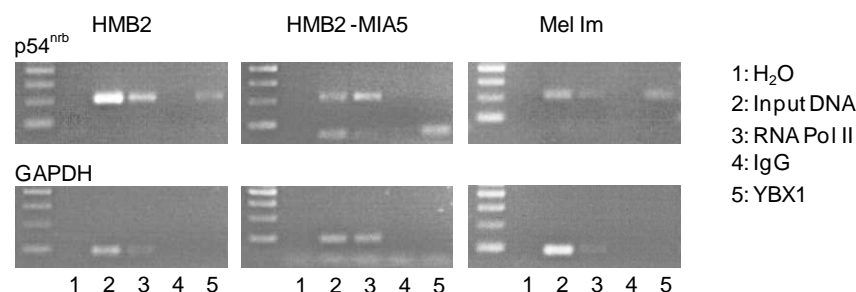


Abbildung 43: Bindung von YBX1 an den *p54^{nrb}*-Promotor. DNA-Proben des isolierten Chromatins (Input DNA) und aus den jeweiligen ChIP-Reaktionen (Immunopräzipitationen mit RNA Pol II, IgG und YBX1 Antikörper) wurden in die qRT-PCR unter Verwendung von spezifischen Primerpaaren gegen *GAPDH* (positiv Kontrolle) und für den Bereich, der die YBX1-Bindestelle im *p54^{nrb}*-Promotor umspannt eingesetzt. Alle PCR Fragmente konnten in der Input DNA der jeweiligen Zellen (Spur 2) und in den RNA Pol II-ChIP-Proben (Spur 3) detektiert werden. In HMB2 und Mel Im Zellen konnte ein deutliches *p54^{nrb}*-Fragment in den YBX1-ChIP-Proben nachgewiesen werden (Spur 5). In HMB2 -MIA5 Zellklonen wurde kein *p54^{nrb}*-Fragment in den YBX1-ChIP-Proben amplifiziert (Spur 5) (Schmid *et al.*, 2013).

Zusammenfassend konnte YBX1 als der Transkriptionsfaktor identifiziert werden, über den MIA/CD-RAP die Aktivierung der $p54^{nrb}$ -Transkription steuert. MIA/CD-RAP moduliert dabei die YBX1-Aktivität über dessen Phosphorylierung.

Die Expression des Transkriptionsfaktors YBX1 in Knorpel wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Um die Expression von YBX1 in diesem Gewebe *in vivo* zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von humanen und murinen Knorpel durch Rudolf Jung (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) angefertigt. Die Färbung mit einem spezifischen YBX1-Antikörper führte zu einer starken Färbung von proliferierenden Chondrozyten im Säulenknorpel der Wachstumsfuge und von Zellen im Knochenmark (Abbildung 44 A). Es konnte außerdem eine Expression von YBX1 in Chondrozyten in Knorpel von Maus (Abbildung 44 B) und Mensch (Abbildung 44 C) nachgewiesen werden.

Der Transkriptionsfaktor YBX1 wird somit in Chondrozyten *in vivo* exprimiert.

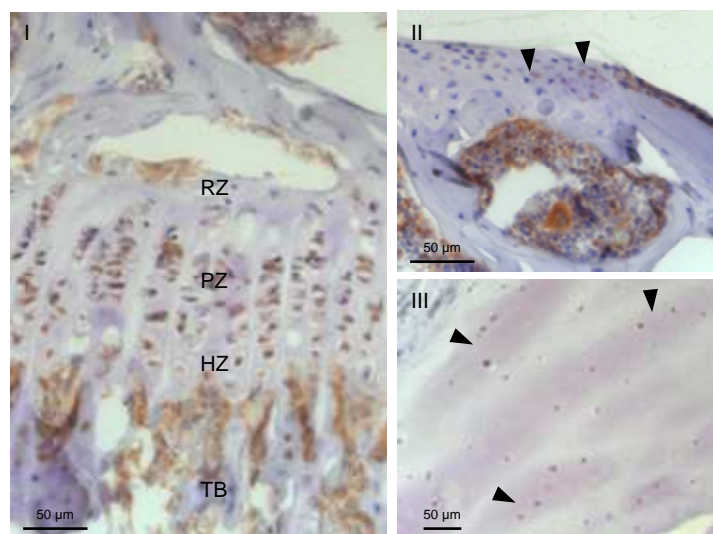


Abbildung 44: Immunhistochemische Färbung von Histologischen Schnitten des Knorpelgewebes gegen YBX1. (I) In der Wachstumsfuge von WT-Mäusen konnte eine starke Expression von YBX1 in Chondrozyten der Proliferationszone sowie in Knochenmarkszellen nachgewiesen werden. In Knorpel von WT-Mäusen (II) und Mensch (III) konnten ebenfalls YBX1-exprimierende Chondrozyten detektiert werden. Die Pfeile markieren YBX1-positive Zellen. RZ: Reserve-Zone; PZ: Proliferations-Zone; HZ Hypertrophe-Zone; TB: Trabekulärer Knochen (Schmid *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht).

Ein Teil dieser Untersuchungen konnten bereits veröffentlicht werden (Schmid *et al.*, 2013). Ein weiteres Manuskript wurde zur Veröffentlichung eingereicht (Schmid *et al.*). Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2 wurden in einer gesonderten Veröffentlichung, gleichberechtigt publiziert (Schiffner *et al.*, 2011).

3.3 *In vivo* (embryonal) und *in vitro* Untersuchungen zur Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese

Wie bereits unter Abschnitt 1.4.4 beschrieben, sind MIA-*knockout*- (MIA-/-) Mäuse lebensfähig, entwickeln sich normal und selbst durch lichtmikroskopische Untersuchungen sind keine Missbildungen der Organe festzustellen (Moser *et al.*, 2002). Elektronenmikroskopische Untersuchungen brachten jedoch ultrastrukturelle Defekte des Knorpels betreffend der Kollagenfaserdichte, des Durchmessers und der Anordnung hervor (Moser *et al.*, 2002). Es konnte somit ein schwacher Phänotyp in adulten Mäusen nachgewiesen werden. Um aufzuklären warum sich MIA-/- Mäuse normal entwickeln, sollen im letzten Abschnitt dieser Arbeit mögliche Auswirkungen des MIA/CD-RAP-Verlustes auf die Knorpelentwicklung in der Embryogenese *in vivo* untersucht werden. Das Aufdecken von molekularen Veränderungen in der embryonalen Entwicklung und möglichen redundanten Mechanismen könnte den schwachen Phänotyp trotz des MIA/CD-RAP-Verlustes in adulten Tieren erklären. Hierfür wurde zunächst der Prozess der enchondralen Ossifikation anhand des Oberschenkelknochens verschieden alter Wildtyp- und MIA-/- Embryonen untersucht. Die Paraffinschnitte und die HE-Färbungen wurden von Martina Waeber (Abteilung für Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) angefertigt.

3.3.1 Untersuchung der enchondralen Ossifikation in MIA-*knockout*-Mäusen

Um phänotypische Unterschiede in der Skelettentwicklung von Embryonen aus Wildtyp- bzw. MIA-*knockout*-Zuchten aufgrund von unterschiedlichen Wurfgrößen, Ernährungszustand des Muttertiers und Unterschiede im Zeitpunkt der Befruchtung zu minimieren, wurde eine heterozygote MIA-*knockout*-Mauslinie generiert (siehe 5.3.8.3). Durch die Verpaarung von heterozygoten MIA-*knockout*-Elterntieren, können Wildtyp- (WT) und homozygote MIA-*knockout*- (MIA-/-) Embryonen parallel aus demselben Wurf untersucht werden (siehe 5.3.8.5). Es wurde die mRNA-Expression von drei elementaren Markern der Chondrogenese bzw. der enchondralen Ossifikation per *in situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten untersucht: Col2a1 (Dessau *et al.*, 1980; Nah *et al.*, 1988), Col10a1 (Shen, 2005; Mueller und Tuan, 2008) und Sox9 (Wright *et al.*, 1995). Col2a1 (Ng *et al.*, 1997) and Sox9 (Zhao *et al.*, 1997; Akiyama *et al.*, 2002) werden in proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsfuge exprimiert, wobei die Col10a1-Expression auf postmitotische hypertrophe Chondrozyten beschränkt ist (Schmid und Linsenmayer, 1985). Die Hybridisierung wurde an Oberschenkelknochen von 14,5, 15,5 und 16,5 Tage alten WT- und MIA-/- Embryonen aus je einem Wurf durchgeführt. Es wurde die Länge der gefärbten Genexpressionsbereiche im Knochen gemessen, auf die

Gesamtknochenlänge bezogen und grafisch dargestellt. Die Färbeintensität spielte dabei keine Rolle und wurde nicht berücksichtigt.

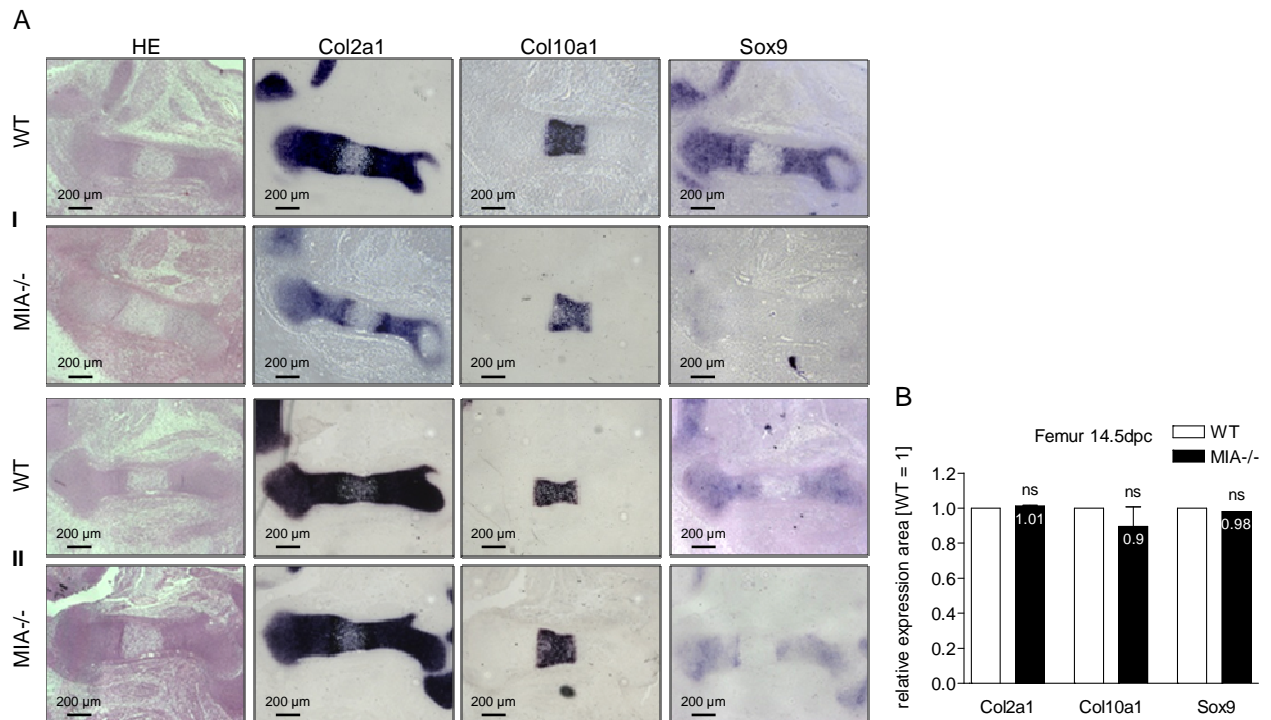


Abbildung 45: Analyse von Differenzierungsmarkern der enchondralen Ossifikation an 14,5 Tage alten MIA^{-/-} Embryonen. (A) Nachweis der Col2a1-, Col10a1- und Sox9-Expression per *in situ* Hybridisierung und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) an histologischen Schnitten von Oberschenkelknochen von WT und MIA^{-/-} Nachkommen aus je einem Wurf. Es sind zwei (I + II) von drei Würfen gezeigt. (B) Es war kein signifikanter Unterschied in der Größe der gefärbten Col2a1-, Col10a1- und Sox9-Bereiche zwischen WT und MIA^{-/-} Embryonen festzustellen (ns: nicht signifikant). Die Länge der gefärbten Genexpressionsbereiche wurde gemessen und auf die Gesamtknochenlänge bezogen (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

An Tag 14,5 der Entwicklung war kein Unterschied im Expressionsbereich von Col2a1, Col10a1 oder Sox9 zwischen WT- und MIA^{-/-} Mäusen eines Wurfs zu erkennen (Abbildung 45).

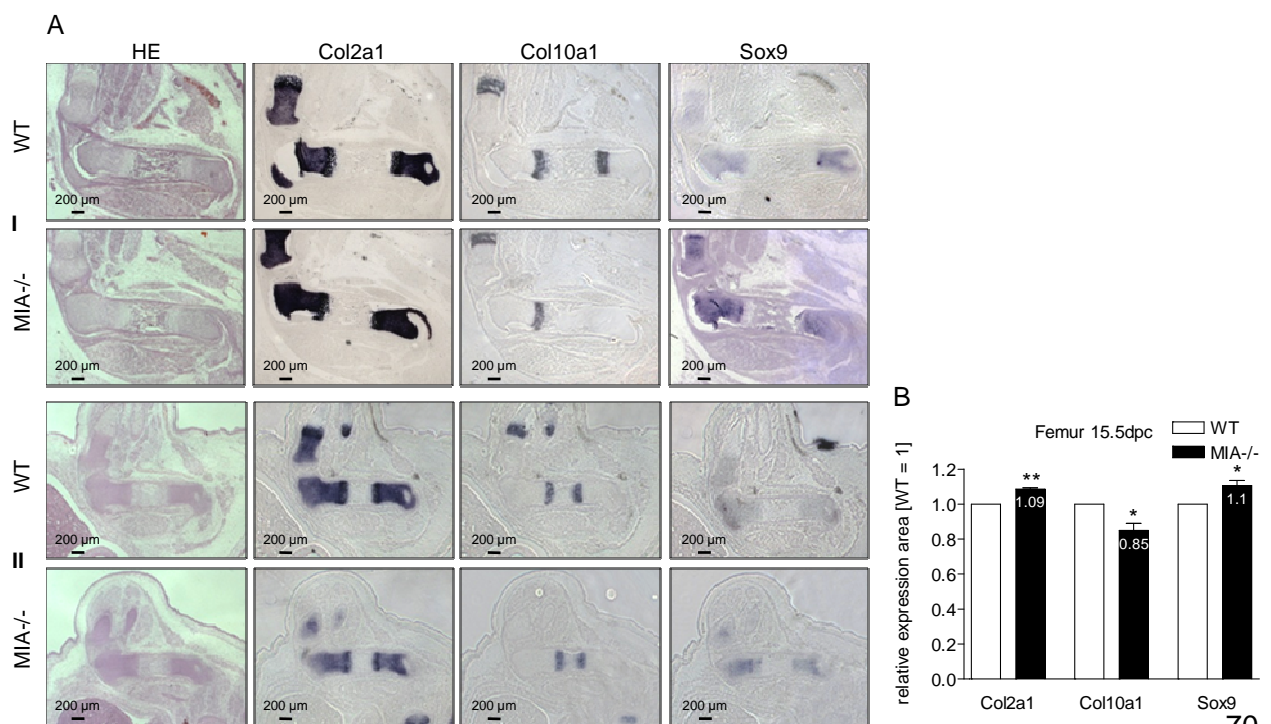


Abbildung 46: Analyse von Differenzierungsmarkern der enchondralen Ossifikation an 15,5 Tage alten MIA-/- Embryonen. (A) Nachweis der Col2a1-, Col10a1- und Sox9-Expression per *in situ* Hybridisierung und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) an histologischen Schnitten von Oberschenkelknochen von WT und MIA-/- Nachkommen aus je einem Wurf. Es sind zwei (I + II) von drei Würfen gezeigt. (B) Die Größe der Col2a1- und Sox9-Expressionsbereiche waren in MIA-/- Embryonen im Vergleich zu WT signifikant erhöht (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). Der Col10a1-gefärbte Bereich war in MIA-/- Embryonen im Vergleich zu WT signifikant kleiner (*: $p < 0,05$). Die Länge der gefärbten Genexpressionsbereiche wurde gemessen und auf die Gesamtknochenlänge bezogen (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

In Übereinstimmung mit einem größeren gefärbten Sox9-Bereich, war auch der gefärbte Col2a1-Bereich in MIA-/- Embryonen an Tag 15,5 der Entwicklung vergrößert. Interessanterweise war der Col10a1-positive Expressionsbereich in MIA-/- Embryonen im Vergleich zu WT kleiner (Abbildung 46). An Tag 16,5 der Embryonalentwicklung waren die Col2a1- und Sox9-gefärbten Bereiche in MIA-/- Embryonen weiterhin größer. Der Col10a1-positive Expressionsbereich war in MIA-/- Embryonen im Vergleich zu WT jetzt jedoch deutlich größer (Abbildung 47). Es konnte somit eine Kompensation des kleineren Col10a1-Expressionsbereichs an Tag 15,5, an Tag 16,5 der Embryogenese in MIA-/- Mäusen gezeigt werden.

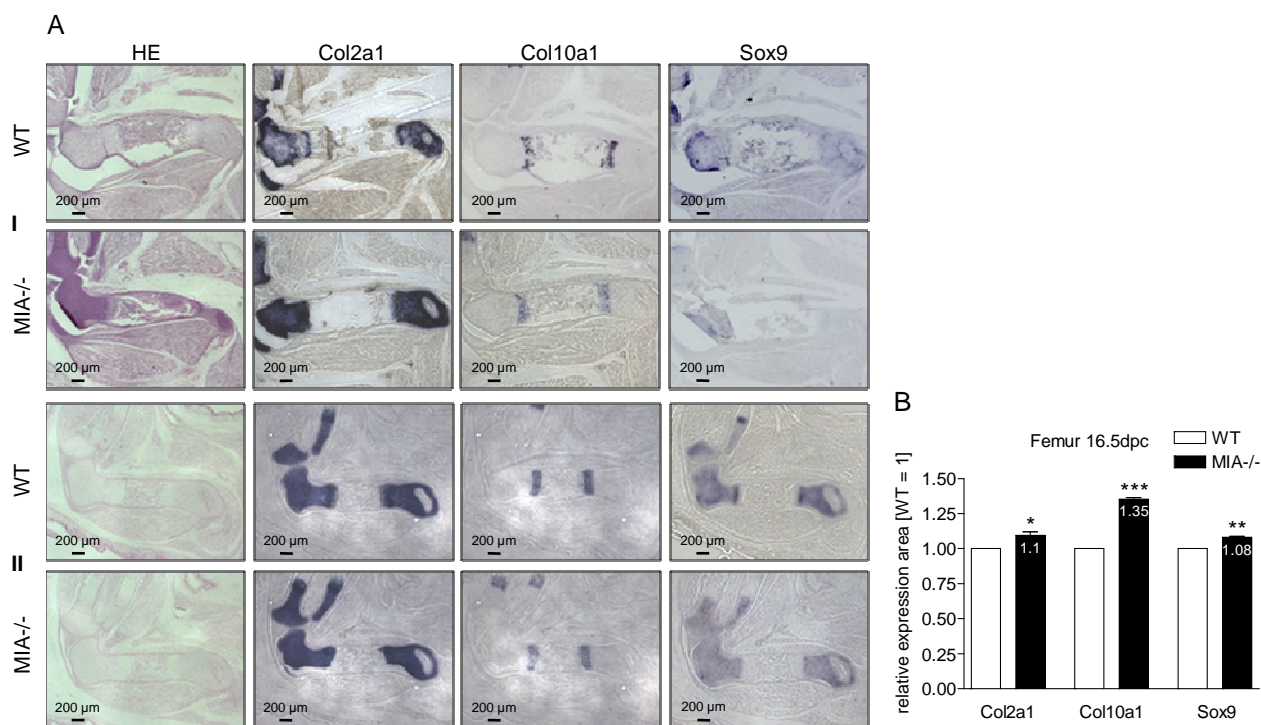


Abbildung 47: Analyse von Differenzierungsmarkern der enchondralen Ossifikation an 16,5 Tage alten MIA-/- Embryonen. (A) Nachweis der Col2a1-, Col10a1- und Sox9-Expression per *in situ* Hybridisierung und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) an histologischen Schnitten von Oberschenkelknochen von WT und MIA-/- Nachkommen aus je einem Wurf. Es sind zwei (I + II) von drei Würfen gezeigt. (B) Die Col2a1-, Col10a1- und Sox9-Expressionsbereiche waren in MIA-/- Embryonen im Vergleich zu WT signifikant größer (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Die Länge der gefärbten Genexpressionsbereiche wurde gemessen und auf die Gesamtknochenlänge bezogen (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

Ob diese Unterschiede in der Skelettentwicklung Auswirkungen auf die Knochenlänge haben, wurde die Länge des Oberschenkelknochens in WT- und MIA-/- Embryonen untersucht. Es

konnte in keinem der untersuchten embryonalen Entwicklungsstadien Veränderungen der Knochenlänge nachgewiesen werden (Abbildung 48).

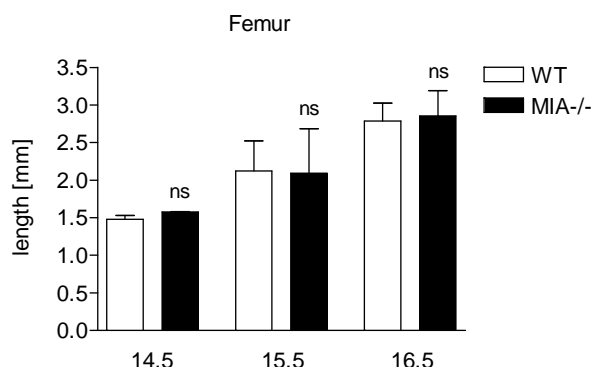


Abbildung 48: Untersuchung der Oberschenkelknochenlänge von 14,5, 15,5 und 16,5 Tage alten Embryonen. Die Oberschenkelknochenlänge unterschied sich in keinem Entwicklungsstadium signifikant zwischen WT und MIA^{-/-} (ns: nicht signifikant) (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

3.3.2 Untersuchung von Regulatoren der hypertrophen Differenzierung in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP

Diese ersten Erkenntnisse zeigten Veränderungen in der frühen Phase der enchondralen Ossifikation von MIA^{-/-} Embryonen, im Übergang von proliferierenden Col2a1- und Sox9-exprimierenden Chondrozyten zu hypertrophen Col10a1-positiven Zellen. Um Effekte des MIA/CD-RAP-Verlusts auf eine direkte Veränderung der hypertrophen Differenzierung zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Ap-2 ϵ und Runx2 in differenzierten murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC), isoliert aus WT- und MIA^{-/-} Mäusen, *in vitro* per qRT-PCR analysiert. Ap-2 ϵ (Wenke *et al.*, 2009) und Runx2 (Enomoto *et al.*, 2000; Stricker *et al.*, 2002) steuern essenzielle Abläufe in der Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten.

Die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Ap-2 ϵ und Runx2 unterschied sich nicht zwischen WT- und MIA^{-/-} mMSC (Abbildung 49). Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die MIA/CD-RAP-abhängige Regulation von Transkriptionsfaktoren die den Übergang von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten direkt steuern untersucht.

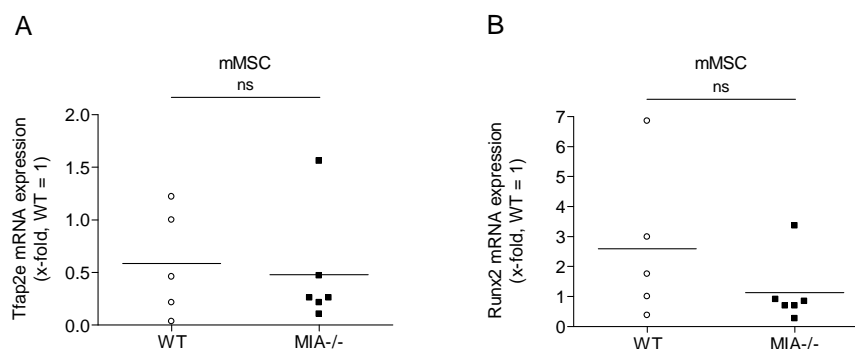


Abbildung 49: Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren essentiell für die hypertrophe Differenzierung auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von Ap-2 ϵ (A) und Runx2 (B) zwischen WT- und MIA^{-/-} mMSC festgestellt werden (ns: nicht signifikant). Es wurde eine WT-mMSC-Charge gleich 1 gesetzt (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

3.3.3 Untersuchung von Regulatoren der Proliferation in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP

Es wurde die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Sox9, Sox6 und L-Sox5, welche die Chondrozyten der Wachstumsfuge in Proliferation halten und über eine Hemmung der hypertrophen Differenzierung den Übergang von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten regulieren untersucht (Akiyama *et al.*, 2002; Smits *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Amano *et al.*, 2009). Die Sox9- und Sox6-mRNA-Expression war in differenzierten MIA-/- mMSC erhöht (Abbildung 50 A, B). Die L-Sox5-Expression unterschied sich nicht zwischen WT- und MIA-/- mMSC (Abbildung 50 C). Die Untersuchung des Transkriptionsfaktors Ap-2 α , der auch in der Differenzierung von Chondrozyten eine Rolle spielt (Huang *et al.*, 2004), ergab ebenfalls erhöhte mRNA-Expressionslevels in MIA-/- mMSC (Abbildung 50 D). Die bereits unter Abschnitt 3.1.3 gezeigte verminderte p54^{nrb}-Expression in MIA/CD-RAP negativen Geweben wurde auf mRNA-Ebene in MIA-/- mMSC bestätigt (Abbildung 50 E).

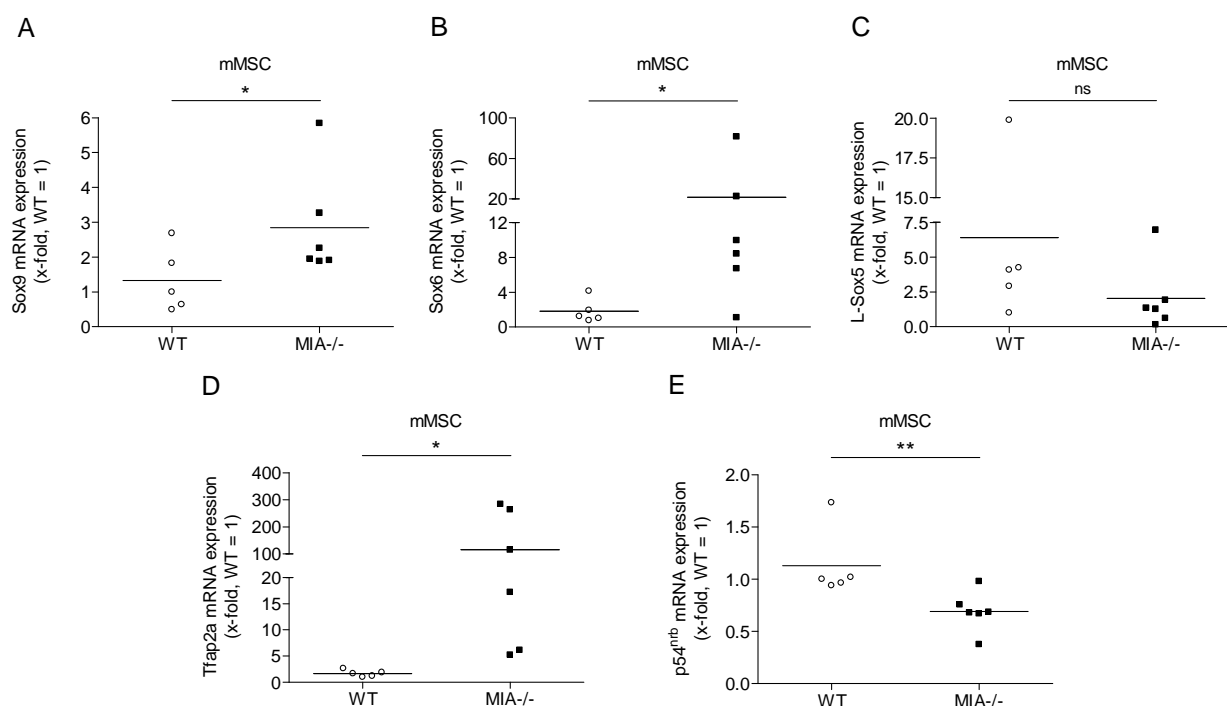


Abbildung 50: Expressionsanalyse von frühen Markern der Chondrogenese auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP. Die Expression von Sox9 (A) und Sox6 (B) war in MIA-/- mMSC im Vergleich zu WT signifikant erhöht (*: $p < 0,05$). (C) Die L-Sox5-mRNA-Expression unterschied sich nicht signifikant zwischen MIA-/- und WT-mMSC (ns: nicht signifikant) (unveröffentlichte Daten). (D) Ap-2 α war in MIA-/- mMSC im Vergleich zu WT signifikant erhöht (*: $p < 0,05$). (E) In MIA-/- mMSC konnte eine signifikant reduzierte p54^{nrb}-Expression im Vergleich zu WT bestätigt werden (**: $p < 0,01$). Es wurde eine WT-mMSC-Charge gleich 1 gesetzt (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

Neben Sox6 und L-Sox5 wurde p54^{nrb} als ein weiteres Mitglied des Sox9 Transkriptionskomplexes beschrieben. Nicht nur Sox6 und L-Sox5 (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001), sondern auch p54^{nrb} erhöht die transkriptionelle Aktivität von Sox9 (Hata *et al.*, 2008). Um zu überprüfen, ob die Überexpression von Sox9 und Sox6 in MIA-/- mMSC auf

eine verminderte $p54^{nrb}$ -Expression zurückzuführen ist, wurde humanes $p54^{nrb}$ ($hp54^{nrb}$) in MIA-/- mMSC überexprimiert und die Veränderung der mRNA-Expression untersucht. Die Überexpression von $hp54^{nrb}$ in MIA-/- mMSC führte zu einer verminderten Sox9- und Sox6-Expression. Die Expression von Ap-2 α war jedoch nicht verändert (Abbildung 51).

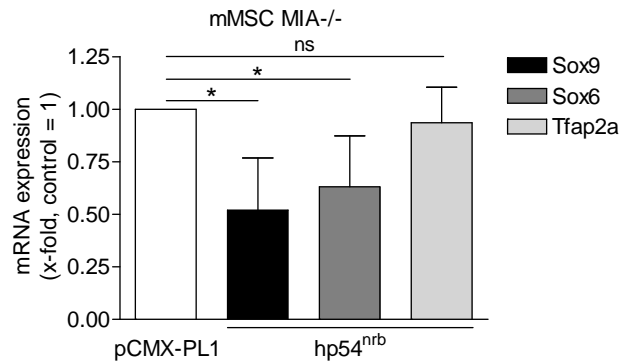


Abbildung 51: Analyse der Expression von frühen Markern der Chondrogenese auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in Abhängigkeit von $p54^{nrb}$. Die Überexpression von humanem $p54^{nrb}$ ($hp54^{nrb}$) in MIA-/- mMSC führte zu einer signifikanten Verminderung der Sox9 und Sox6 Expression im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen (*: $p < 0,05$). Die Expression von Ap-2 α war im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (ns: nicht signifikant) (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

3.3.4 Die Beteiligung von AP1 und CREB in der MIA/CD-RAP-abhängigen Chondrogenese

Um den Mechanismus aufzudecken, über den die verspätete hypertrophe Differenzierung in MIA-/- Mäusen an Tag 16,5 der Embryogenese ausgeglichen wurde, wurde die Rolle von AP1 (Activator protein 1) und CREB (cAMP response element-binding protein), zwei wichtigen Transkriptionsfaktoren der Chondrogenese (Ionescu *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2001a), untersucht. Es wurde zunächst die transkriptionelle Aktivität von AP1 und CREB in differenzierten mMSC unter Verwendung eines AP1- (AP1Luc) und CRE- (CRELuc) Reporterkonstrukts per Luciferase-Reportergen-Assays analysiert.

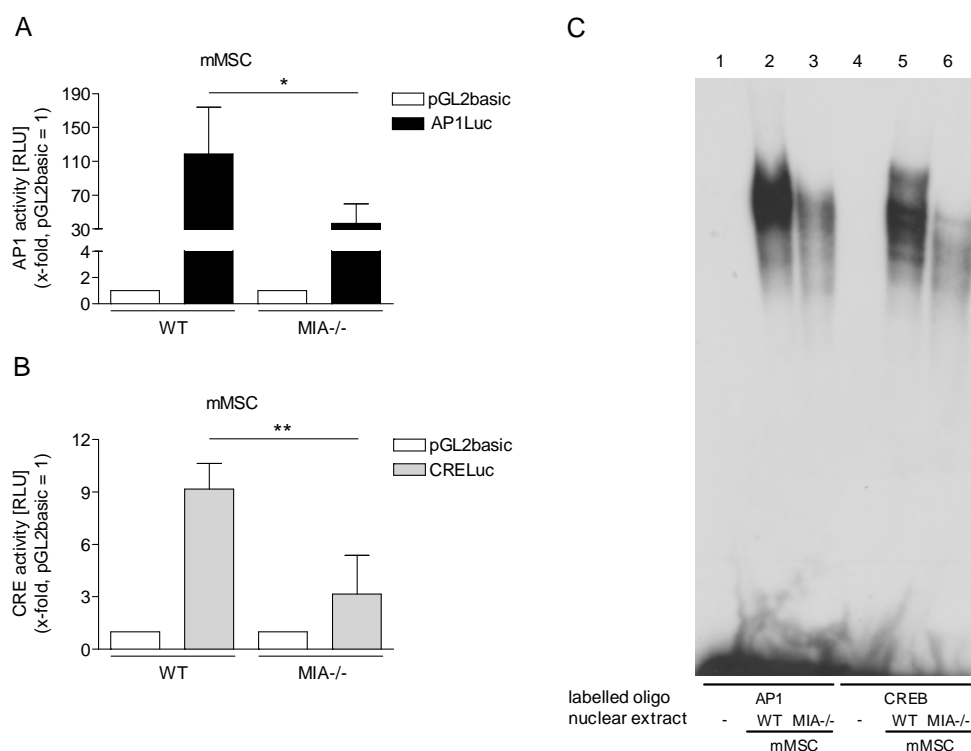


Abbildung 52: Einfluss von MIA/CD-RAP auf AP1 und CREB. Die AP1- (A) und CRE- (B) Aktivität, analysiert per Reporter-gen-Assay, war in differenzierten MIA/- mMSC im Vergleich zu WT signifikant vermindert (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). (C) Electrophoretic-mobility-shift-assays ergaben einen DNA-Protein-Komplex nach Inkubation von Kernproteinen aus WT-mMSC mit dem AP1-Konsensus-Oligonukleotid (Spur 2) und fünf DNA-Protein Komplexe nach Inkubation mit dem CREB-Konsensus-Oligonukleotid (Spur 5). Die Bindung von Kernproteinen aus MIA/- mMSC an das AP1- (Spur 3) und CREB- (Spur 6) Konsensus-Oligonukleotid war deutlich vermindert (Schmid und Bosserhoff, zur Veröffentlichung eingereicht).

Die AP1- und CRE-Aktivität war in MIA/- mMSC reduziert (Abbildung 52 A, B). Electrophoretic Mobility Shift Assays bestätigte die verminderte Bindung von Kernprotein aus differenzierten MIA/- mMSC an das AP1- und CREB-Konsensus-Oligonukleotid (Abbildung 52 C).

Es konnte somit eine Modulation des AP1- und CREB-Signalweges in MIA/- mMSC gezeigt werden.

Von den Ergebnissen dieses Abschnittes wurde ein Manuskript ausgearbeitet und zur Veröffentlichung eingereicht (Schmid und Bosserhoff).

4. Diskussion

MIA/CD-RAP wird zu Beginn der Chondrogenese zusammen mit Kollagen Typ II und Aggrecan exprimiert (Dietz und Sandell, 1996; Onoue *et al.*, 2011) und bleibt während der Chondrozytendifferenzierung erhalten (Bosserhoff *et al.*, 1997b). MIA/CD-RAP konnte zusätzlich als Marker für die Chondrozytendifferenzierung charakterisiert werden (Bosserhoff und Buettner, 2003), was eine Rolle in der Chondrogenese nahelegt. Erste Erkenntnisse hierzu konnten bereits in unserer Arbeitsgruppe erbracht werden. MIA/CD-RAP kann die BMP2 induzierte osteogene Differenzierung von mesenchymalen Zellen in die chondrogene Richtung modulieren (Tscheudschilsuren *et al.*, 2006). Genauer konnte publiziert werden, dass MIA/CD-RAP die ERK1/2-Signaltransduktionskaskade über eine Bindung und Inhibition der Integrin alpha 5-Aktivität hemmt. Eine negative Regulation dieses ERK1/2-Signalweges fördert die Chondrozytendifferenzierung (Forsyth *et al.*, 2002). Es konnte somit gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP die chondrogene Differenzierung vorantreibt und die osteogene Differenzierung hemmt (Schubert *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine Funktion von MIA/CD-RAP während der Chondrogenese. Bis jetzt wurde die Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese noch nicht im Detail erforscht. Gegenstand dieser Dissertation war es daher diese Rolle näher zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Dissertation unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur diskutiert.

4.1 Neue Erkenntnisse zur Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel

Bei der Untersuchung von spontan auftretender Osteoarthritis in zwei Jahre alten Mäusen konnte eine verminderte Ausbildung von Osteoarthritis in MIA-*knockout*-Mäusen beobachtet werden (unveröffentlichte Daten). Es wurde daher zunächst anhand von zwei Mausmodellen die Knorpelstabilität und die Knorpelbildung *in vivo* in MIA-*knockout*-Mäusen untersucht.

4.1.1 Erhöhte Knorpelregeneration in MIA-*knockout*-Mäusen während Osteoarthritis und Frakturheilung

In einem Frakturheilungsmodell sowie in einem Modell zur Induktion von Osteoarthritis (Osteoarthritismodell) wurde ein deutlich erhöhtes Knorpelregenerationspotential durch den Verlust von MIA/CD-RAP nachgewiesen. Im Osteoarthritismodell konnte eine vermehrte Anzahl an proliferierenden Chondrozyten in MIA-*knockout*-Mäusen festgestellt werden, was das hohe regenerative Potential im adulten Knorpel deutlich machte. Folglich wirkten die proliferierenden Chondrozyten zusammen mit ihrer erhöhten Matrixproduktion nicht nur der

Schwere der Osteoarthritis in MIA-*knockout*-Mäusen entgegen, was an Tag 21 des Modells im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu erkennen war, sondern führten sogar zu einer Regeneration der Knorpelschädigung an Tag 42, wobei die Osteoarthritis in Wildtyp-Mäusen weiter fortschritt. Die Schwere der Osteoarthritis verringerte sich 42 Tage nach Induktion des Modells in MIA-*knockout*-Mäusen auf das Niveau der Kontrollgruppe, in der keine Osteoarthritis induziert wurde. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig ein erhöhtes Regenerationspotential des Knorpels nach MIA/CD-RAP-Verlust.

Bei der Osteoarthritis handelt es sich um eine progressive Gelenkserkrankung, charakterisiert durch eine fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels vor allem durch eine unkontrollierte Proteolyse der Komponenten der extrazellulären Matrix (Umlauf *et al.*, 2010). Eine abnormale mechanische Belastung und Entzündungen der Gelenkkapsel tragen wahrscheinlich zu einer Fehlregulation der Chondrozytenfunktion bei, welche ein Ungleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Prozessen der Chondrozyten im Umbau der Knorpelmatrix begünstigen (Goldring und Goldring, 2007). Die Beteiligung einer erhöhten Produktion von Proteinasen, wie den Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und den Aggrecanasen (ADAMTS) bei der Entstehung von Knorpelschäden, die schließlich zu Osteoarthritis führen, konnte bereits gezeigt werden (Cawston und Wilson, 2006; Plaas *et al.*, 2007). Die Ereignisse, die diesen destruktiven Veränderungen zu Grunde liegen, sind aber bis heute noch nicht vollständig verstanden (Pritzker, 1994). Die Anwendung des in dieser Arbeit beschriebenen operativen Osteoarthritismodells ergab auch beim Ausschalten von anderen Molekülen als MIA/CD-RAP eine Modulierung der Ausbildung von Osteoarthritis. Wurde Mmp13 konditionell in Chondrozyten von adulten Mäusen ausgeschaltet bzw. wurde der Mmp13 Inhibitor CL82198 intraperitoneal in Wildtyp-Mäusen injiziert, konnte eine Verminderung der Progression der Osteoarthritis beobachtet werden (Wang *et al.*, 2013). In den konditionellen Mmp13-*knockout*-Mäusen war die Knorpeldegeneration vermindert, was auf eine erhöhte Kollagen Typ II- und Proteoglykan-Expression und damit dickeren Gelenkknorpels im Vergleich zu den Kontrollmäusen zurückzuführen war (Wang *et al.*, 2013). Mmp13 ist eines der Hauptenzyme, welches für die Degradation der Knorpelmatrix verantwortlich ist (Vincenti und Brinckerhoff, 2002). Es baut neben Kollagen Typ II und Typ IX auch Proteoglykane in der Knorpelmatrix ab (Shiomi *et al.*, 2010). Eine erhöhte Expression von MMP13 bei Patienten mit Schädigungen des Gelenkknorpels (Roach *et al.*, 2005) sowie das spontane Auftreten von Osteoarthritis-ähnlichen Knorpelschäden in Mmp13-transgenen-Mäusen (Neuhold *et al.*, 2001) machen die Rolle dieses Moleküls in der Knorpeldegeneration deutlich. Zwei weitere Faktoren, die an der Knorpeldegradation während der Osteoarthritis beteiligt sind, sind ADAMTS4 (A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs) und ADAMTS5 (Wang *et al.*, 2013). ADAMTS4 und ADAMTS5 sind die Hauptaggrecanasen in der Entstehung von Osteoarthritis. Es konnte in ADAMTS5-*knockout*- und ADAMTS5/ADAMTS4 doppel-*knockout*-Mäusen eine

Verminderung der Knorpelschädigung in einem operativ induzierten Osteoarthrosemodell im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Glasson *et al.*, 2005; Majumdar *et al.*, 2007). Auch heterozygote Runx2-defiziente-Mäuse zeigen eine verminderte Knorpelschädigung, was auf eine verminderte Mmp13-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zurückzuführen war (Kamekura *et al.*, 2006). Neben der in dieser Arbeit gezeigten verminderten Knorpelschädigung in MIA-*knockout*-Mäusen sind somit auch andere Moleküle beschrieben, die nach deren Ausschalten eine verminderte Knorpeldegeneration in Osteoarthrosemodellen zeigten.

Regenerative Eigenschaften von geschädigtem Knorpel, wie hier in der MIA-*knockout*-Maus gezeigt werden konnte, konnten auch dem Molekül CTGF (Connective tissue growth factor) zugewiesen werden (Nishida *et al.*, 2004). In einem Osteoarthrosemodell führte die Injektion von CTGF in die Gelenkhöhle von Ratten zu einer Heilung der Knorpelschäden zu einem Maße, so dass dieser Knorpel histologisch dem Knorpel der Kontrollratten ähnelte (Nishida *et al.*, 2004). Wurden dem Gelenksknorpel operativ Schädigungen zugefügt, wurden diese innerhalb von 4 Wochen nach der Operation unter Behandlung mit rekombinanten CTGF durch neue Knorpelmatrix wieder aufgefüllt (Nishida *et al.*, 2004).

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Frakturheilungsmodell konnte interessanterweise eine erhöhte Knorpelbildung im Frakturkallus von MIA-*knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gezeigt werden. Dies war auf eine erhöhte Proliferation von Chondrozyten im sich gebildeten Kallus um die Knochenfraktur unter MIA/CD-RAP-Defizienz zurückzuführen.

Bereits Untersuchungen von Sakano und Kollegen ergaben eine MIA/CD-RAP-Proteinexpression im Knorpel des heilenden Knochens, in einem Frakturheilungsmodell an Mäusen (Sakano *et al.*, 1999). Auch von anderen Molekülen konnte eine Beteiligung an der Knorpelbildung während der Frakturheilung gezeigt werden. Prostaglandin-E2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Knochenbildung (Kobayashi und Narumiya, 2002; Li *et al.*, 2004b). In einem stabilisierten Frakturheilungsmodell an *knockout*-Mäusen in denen der Prostaglandin-E2-Rezeptor EP1 ausgeschaltet wurde, konnte eine erhöhte Knorpelregeneration, was auf eine erhöhte Knorpelbildung zurückzuführen war, nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2011). Rekombinantes BMP2 und BMP7 sind die bis jetzt einzigen klinisch bestätigten Therapieansätze, um die Knochenheilung in Menschen zu stimulieren (Einhorn *et al.*, 2003; White *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass BMP2 für die Knochenbildung, aber nicht für die Initiation der Frakturheilung entbehrlich ist (Tsuji *et al.*, 2006). In einem unstabilisierten Frakturheilungsmodell führte die Behandlung mit BMP2 zu einer Erhöhung der Knorpelbildung in der frühen Phase der Heilung (Yu *et al.*, 2010).

Unter normalen Bedingungen befinden sich die Chondrozyten in einem Ruhezustand und sorgen durch die Sekretion von Proteoglykanen und anderen nicht-kollagenen Molekülen

(Maroudas *et al.*, 1998), zu einem gewissen Maße für die Erneuerung der Knorpelmatrix (Goldring und Goldring, 2007). Kollagen Typ II wird im Vergleich dazu in einem nur geringen Maße weiterhin produziert, da es eine errechnete Halbwertszeit von 117 Jahren besitzt, sofern es nicht beschädigt wird (Verzijl *et al.*, 2000). Die Chondrozyten des adulten Knorpels können aber insgesamt keine neue Knorpelmatrix produzieren, die dieselben Eigenschaften wie der Knorpel besitzt, der primär bei der Entwicklung entsteht, was eine vollständige Regeneration des Knorpels limitiert (Goldring und Goldring, 2007; Goldring, 2012).

Die aufgeführten Studien zeigen unterschiedliche therapeutische Ansätze für die Regeneration von Gelenksknorpel bzw. um das Ausmaß der Knorpelschädigung bei Osteoarthritis zu vermindern. Sie zeigen ebenfalls Ansätze für die Erhöhung der Knorpelbildung während der Frakturheilung. Auch die Entwicklung eines Inhibitors gegen MIA/CD-RAP würde zum einen protektiv gegenüber der Entstehung von Osteoarthritis wirken und zum anderen die Regeneration von bereits geschädigter Knorpelmatrix in der Osteoarthritis fördern.

4.1.2 Erhöhte Proliferation und verzögerte Differenzierung in MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen

Da beide *in vivo* Modelle einen Einfluss von MIA/CD-RAP auf die Proliferation von adulten Chondrozyten zeigten, wurde die Wirkung von MIA/CD-RAP auf die Proliferation während der Chondrogenese *in vitro* weiter untersucht. Als Modellsystem dienten hierzu primäre murine mesenchymale Stammzellen, isoliert aus MIA-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen. Es konnte eine erhöhte Proliferationsrate von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen durch den Verlust von MIA/CD-RAP gezeigt werden, was auf eine Förderung der Expression des Zellzyklusregulators Cyclin D2 zurückzuführen war. Cyclin D2 fördert den Fortschritt des Zellzyklus von der G0/G1 in die S-Phase und ist somit ein wichtiger Initiator der Zellproliferation (Kobayashi *et al.*, 2009).

Wurde die mesenchymale Kondensation durch eine Behandlung mit TGF- β 3 induziert, kam es zu keiner Verminderung der Proliferation von MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Wildtyp-Zellen hingegen verlangsamten ihr Zellwachstum. TGF- β 3 führt normalerweise zur Induktion der Chondrogenese (Roark und Greer, 1994), indem es die Proliferation von mesenchymalen Zellen mindert und die Kondensation fördert (Jin *et al.*, 2007). Die Proliferation ist in MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen somit selbst nach Induktion der Kondensation gleich hoch, was auf eine Verzögerung der mesenchymalen Kondensation schließen lässt. Ob die darauf folgende Differenzierung zu Chondrozyten ebenfalls durch MIA/CD-RAP verändert ist, wurde anhand der Aktivierung der Kollagen Typ II- (Col2a1) Expression, eines zentralen Markers der Chondroblastendifferenzierung (Kravis und Upholt, 1985; Kosher *et al.*, 1986), untersucht. Die Col2a1-Promotoraktivität war in MIA-

defizienten mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert, was auf eine Verzögerung der Differenzierung zu Chondrozyten schließen ließ. Die mesenchymalen Zellen werden somit in MIA-*knockout*-Mäusen länger in der Proliferation gehalten und gehen später in die chondrogene Differenzierung über. Dies wäre auch für regenerative Effekte förderlich, da Läsionen durch eine erhöhte Zahl von mesenchymalen Zellen schneller geheilt werden könnten.

4.1.3 Das Protein p54^{nrb} vermittelt die Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese

Als molekulare Ursache für die Modifikation der Chondrogenese in MIA-*knockout*-Mäusen konnte im Rahmen dieser Arbeit das Protein p54^{nrb} identifiziert werden, von dem eine stark verminderte Expression in MIA-defizienten Geweben nachgewiesen werden konnte. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass p54^{nrb} die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors Sox9 durch eine direkte Interaktion fördert (Hata *et al.*, 2008). Sox9 stellt einen essenziellen Faktor für die Initiation der Chondrogenese (Bi *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002) sowie für die weitere Progression der Chondrogenese dar, da er die Differenzierung von kondensierten mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten vermittelt (Akiyama *et al.*, 2002). Sox9 aktiviert dabei unter anderem die Transkription des knorpelspezifischen Gens *Col2a1* (Zhou *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997). P54^{nrb} erhöht in Zusammenarbeit mit Sox9 dessen transkriptionelle Aktivierung des *Col2a1*-Promotors, was die Differenzierung von Chondroblasten zu Chondrozyten vorantreibt (Hata *et al.*, 2008). MIA/CD-RAP fördert die Differenzierung von Chondroblasten zu Chondrozyten über eine Aktivierung der p54^{nrb}-Expression, was die Transkription des *Col2a1*-Promotors erhöht. Diese wird sehr wahrscheinlich über den Transkriptionsfaktor Sox9 vermittelt. Kollagen Typ II ist ein spezifischer Marker für die Chondrozytendifferenzierung und wird als Hauptkomponenten der späteren reifen Knorpelmatrix am Anfang der Differenzierung exprimiert (Kravis und Upholt, 1985; Kosher *et al.*, 1986). Es konnten noch weitere Transkriptionspartner von Sox9 identifiziert werden, welche die Sox9 abhängige Transkription aktivieren. Neben p54^{nrb} (Hata *et al.*, 2008) kolokalisieren und interagieren auch Znf219 (Zinc finger protein 219) und Arid5a (AT rich interactive domain 5A) direkt mit Sox9 im Zellkern (Takigawa *et al.*, 2010; Amano *et al.*, 2011). Znf219 verstärkt die Sox9 abhängige Aktivierung des *Col2a1* Promotors. Es wird vermutet, dass Znf219 über eine Zinkfinger-Domäne als Adapterprotein, für die Rekrutierung von weiteren Transkriptionspartnern, in der Sox9 vermittelten transkriptionellen Regulation dient (Takigawa *et al.*, 2010). Arid5a verstärkt ebenfalls die Sox9 abhängige Aktivierung des *Col2a1* Promotors, dabei konnte zusätzlich eine direkte Bindung von Arid5a an den *Col2a1* Promotor gezeigt werden (Amano *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit konnte desweiteren gezeigt werden, dass die MIA/CD-RAP-abhängige Verminderung der Proliferation von mesenchymalen Zellen auf die p54^{nrb}-abhängige Inhibition der Cyclin D2-Expression zurückzuführen war. P54^{nrb} kann an doppelsträngige DNA über eine DNA-Bindedomäne (Basu *et al.*, 1997) sowie an RNA über zwei RNA-Erkennungsmotive binden (Dong *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass p54^{nrb} die Genexpression kontrolliert, indem es editierte mRNA im Zellkern zurückhält (Zhang und Carmichael, 2001; Prasanth *et al.*, 2005; Chen und Carmichael, 2009). Dies könnte der Weg sein, über den p54^{nrb} die Cyclin D2-Expression in mesenchymalen Stammzellen inhibiert, was durch gezielte Experimente aber noch zu untersuchen ist. MIA/CD-RAP fördert somit nicht nur die Differenzierung von Chondroblasten, sondern unterstützt durch die Inhibition der Proliferation von mesenchymalen Zellen die Kondensation (Jin *et al.*, 2007) und somit den Beginn der Chondrogenese (Roark und Greer, 1994). Beide Wirkungen werden über das Protein p54^{nrb} vermittelt.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP für die Chondrozytendifferenzierung benötigt wird. Die Effekte auf die Differenzierung werden dabei über p54^{nrb} vermittelt. Erstaunlicherweise führte der Verlust der MIA/CD-RAP-Expression zu einer Regeneration von adultem Knorpel. Diese Ergebnisse zur Rolle von MIA/CD-RAP im Knorpel helfen dessen molekulare Bedeutung zu verstehen und geben neue Einblicke in die Herangehensweise zur Entwicklung von Therapien für die Knorpelregeneration in Osteoarthritis.

4.2 MIA/CD-RAP fördert die Chondrogenese auf transkriptioneller Ebene

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine MIA/CD-RAP-abhängige Regulation p54^{nrb}-Expression im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass p54^{nrb} die Funktionen von MIA/CD-RAP in der Förderung der Chondrogenese vermittelt. Interessanterweise konnte auch in Melanomgewebe und Melanomzelllinien eine verstärkte p54^{nrb}-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe und normalen Melanozyten nachgewiesen werden (Schiffner *et al.*, 2011). Dabei ist p54^{nrb} als Zielmolekül von MIA an der Entstehung und Progression des malignen Melanoms beteiligt (Schiffner *et al.*, 2011). Im zweiten Abschnitt dieser Dissertation wurde die Fragestellung bearbeitet, ob MIA/CD-RAP die p54^{nrb}-Expression auf transkriptioneller Ebene in der Chondrogenese aktiviert.

4.2.1 MIA/CD-RAP reguliert eine hoch konservierte Region im $p54^{nrb}$ -Promotor

Die Regulation der $p54^{nrb}$ -Transkription durch MIA/CD-RAP wurde anhand von mesenchymalen Stammzellen, isoliert aus Wildtyp- und MIA-*knockout*-Mäusen, analysiert. Es konnte eine MIA/CD-RAP-abhängige Regulation der $p54^{nrb}$ -Expression auf RNA- und Proteinebene auch im Melanom gezeigt werden (Schiffner *et al.*, 2011). Die MIA/CD-RAP-negativen HMB2 Zellklone HMB2 -MIA5 und die mit MIA/CD-RAP-spezifischer siRNA transfizierte Melanomzelllinie Mel Im dienten daher als weitere Modellsysteme, um die Regulation der $p54^{nrb}$ -Expression zu untersuchen. Die Rolle von $p54^{nrb}$ im Melanom war jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertation.

Es konnte eine hoch konservierte Region im $p54^{nrb}$ -Promotor identifiziert werden, die eine MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung zeigte und zwischen dem humanen und murinen Promotor konserviert war. Der Bereich, der für die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung des $p54^{nrb}$ -Promotors verantwortlich war, konnte auf einen kurzen Abschnitt eingegrenzt werden. Es wurde zudem eine MIA/CD-RAP modulierte Transkriptionsfaktorbindestelle anhand von Electrophoretic Mobility Shift Assays und Mutationsstudien identifiziert.

4.2.2 MIA/CD-RAP aktiviert die Transkription des $p54^{nrb}$ -Promotors per YBX1

In silico Analysen zeigten eine mögliche Bindestelle des Transkriptionsfaktors YBX1 (Y-box binding protein 1) im MIA/CD-RAP-abhängigen regulatorischen Bereich des $p54^{nrb}$ -Promotors. YBX1 reguliert die Gentranskription, indem es an ein Y-Box Motiv (eine invertierte CCAAT-Box) bindet, welches bereits in Promotoren von unterschiedlichen Genen gefunden wurde (Mertens *et al.*, 1997; Norman *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von YBX1 an Serin 102 (S102) für dessen transkriptionelle Aktivität nötig ist (Sutherland *et al.*, 2005). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP die YBX1-Aktivität über dessen Phosphorylierung an Serin102 erhöht und YBX1 durch eine direkte Bindung an den identifizierten $p54^{nrb}$ -Promotorbereich die Transkription in Abhängigkeit von MIA/CD-RAP aktiviert. In dieser Arbeit konnte somit YBX1 als der Faktor identifiziert werden, der die MIA/CD-RAP-abhängige Aktivierung der $p54^{nrb}$ -Transkription steuert.

MIA/CD-RAP wird spezifisch während der Chondrogenese exprimiert (Dietz und Sandell, 1996) und wird generell als charakteristisch für Knorpel betrachtet (Bosserhoff *et al.*, 1997b). Es ist bekannt, dass der MIA/CD-RAP-Promotor ein Sox-Konsensusmotiv enthält, an welches Sox9 bindet, was zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Promotoraktivität in Chondrozyten führt (Xie *et al.*, 1999). Dabei ist Sox9 fähig, die MIA/CD-RAP-mRNA-Expression in Chondrozyten zu erhöhen, aber nicht in mesenchymalen Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass Sox9 die MIA/CD-RAP-Expression in reifen Chondrozyten fördert, um den chondrozytären Phänotyp zu

erhalten. Sox9 ist aber nicht fähig, die MIA/CD-RAP-Expression während der Chondrogenese zu aktivieren (Xie *et al.*, 1999). Diese Erkenntnisse passen zu den hier aufgedeckten Ergebnissen, die zeigten, dass MIA/CD-RAP in mesenchymalen Zellen *upstream* von Sox9 agierte und die Chondrogenese über $p54^{nrb}$ förderte (Abbildung 53).

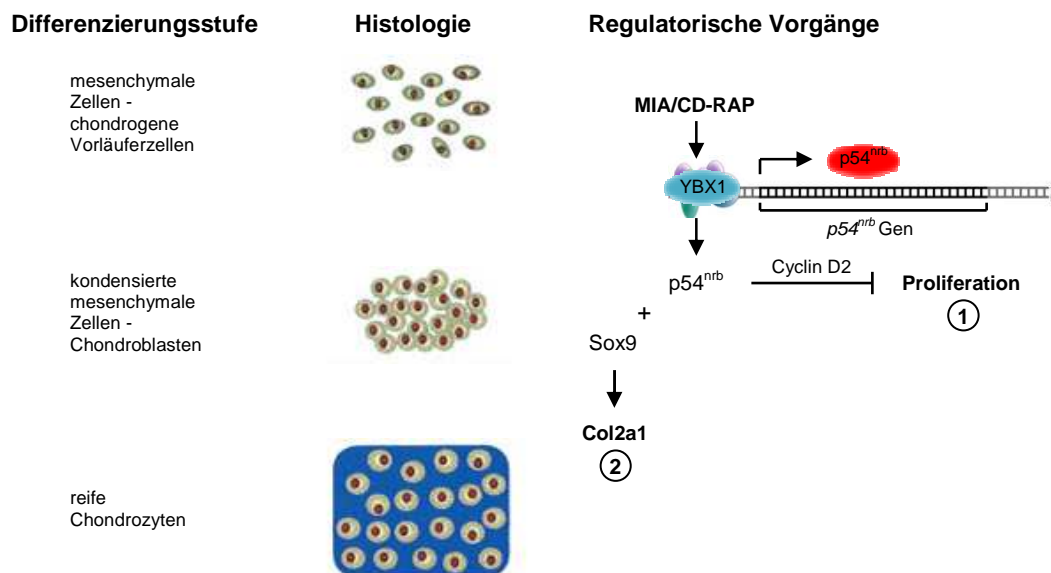


Abbildung 53: Schematische Darstellung der in dieser Dissertation erarbeiteten Rolle von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese. MIA/CD-RAP aktiviert über einen noch unbekannten Mechanismus die YBX1 Aktivität, welche die $p54^{nrb}$ Transkription fördert. $P54^{nrb}$ vermittelt die fördernde Wirkung von MIA/CD-RAP auf die Chondrogenese: (1) $P54^{nrb}$ vermittelt die Proliferationsinhibition von chondrogenen Vorläuferzellen durch eine Hemmung der Cyclin D2 Expression. (2) Durch eine Interaktion mit Sox9 fördert $p54^{nrb}$ die Col2a1 Transkription.

4.2.3 YBX1 in der Chondrogenese

YBX1 wurde vor allem im Zusammenhang mit der Entstehung von unterschiedlichen Karzinomen beschrieben, wo YBX1 verstärkt exprimiert wird (Bargou *et al.*, 1997; Shibao *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2001; Gimenez-Bonafe *et al.*, 2004). Darunter sind auch Karzinome des Skelettsystems, wie dem Osteosarkom (Oda *et al.*, 1998) und dem Synovialsarkom (Oda *et al.*, 2003) zu nennen. Im Bezug auf die Chondrogenese ist bis auf die in dieser Arbeit gezeigten Rolle als Mediator der MIA/CD-RAP gesteuerten Aktivierung der $p54^{nrb}$ -Expression aber wenig bekannt.

YBX1 wird während der embryonalen Entwicklung durchgehend exprimiert und seine Expressionsstärke korreliert mit der Zellproliferation (Grant und Deeley, 1993). Es gibt jedoch Untersuchungen, die auf eine Rolle in der Chondrogenese hinweisen. Der Großteil der YBX1-*knockout*-Embryonen entwickelt sich normal bis Tag 13,5 der Entwicklung, einem Zeitpunkt an dem die Chondrozytendifferenzierung einsetzt. Danach zeigen die YBX1-*knockout*-Embryonen eine ausgeprägte Wachstumshemmung und fortschreitende Mortalität, was auf eine nichtredundante Rolle in der späten embryonalen Entwicklung schließen lässt (Lu *et al.*, 2005).

Sie sterben unter anderem an Atemnot, einem Phänotyp der bei vielen *knockout*-Mäusen beobachtet wurde, denen ein Gen ausgeschaltet wurde, dem eine Rolle in der Chondrogenese zugeordnet werden konnte (Bi *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2001). Der genauen Rolle von YBX1 in der Chondrogenese wurde in dieser Studie jedoch nicht nachgegangen. Es konnte aber gezeigt werden, dass YBX1 für die normale embryonale Entwicklung von unterschiedlichen Organen benötigt wird. Dies wird über eine Verhinderung der frühzeitigen Seneszenz, durch eine Hemmung der Zellzyklusinhibitoren p16 und p21 vermittelt, wie *in vitro* Experimente an primären embryonalen Fibroblasten aus YBX1-*knockout*-Mäusen zeigten (Lu *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wurde per *in situ* Hybridisierungen an 11,5 Tage alten Mausembryonen eine spezifische Expression von YBX1 in den Extremitätenknospen nachgewiesen. In Gewebelysate aus Knochenmark von 2 Monate alten Mäusen konnte ebenfalls eine Expression von YBX1 Protein nachgewiesen werden (Lu *et al.*, 2006). Dies sind deutliche Hinweise auf eine mögliche Rolle von YBX1 in der Knorpelentwicklung.

Diese Hinweise konnten im Rahmen dieser Arbeit, durch den Nachweis von aktivierten YBX1 Proteinen in mesenchymalen Stammzellen bekräftigt werden. Der immunhistochemische Nachweis der YBX1-Expression im Knochenmark, in den Chondrozyten der Wachstumsfuge sowie in adulten Chondrozyten befürwortet außerdem eine Rolle in der Knorpelentwicklung. Das hier gezeigte Expressionsmuster von YBX1 ähnelt dem von MIA/CD-RAP in der Knorpelentwicklung (Dietz und Sandell, 1996; Bosserhoff *et al.*, 1997b), was die Rolle von YBX1 als Mediator der MIA/CD-RAP Wirkung in der Chondrogenese unterstreicht.

4.2.4 Spielt YBX1 auch in anderen Bereichen der Chondrogenese eine Rolle?

Neben der MIA/CD-RAP vermittelten Aktivierung der p54^{nrb}-Expression sind noch weitere Funktionen von YBX1 in der Skelettentwicklung denkbar. YBX1 führt nicht nur zur Aktivierung oder Repression der Genexpression (Mertens *et al.*, 1997; Norman *et al.*, 2001), sondern kann auch die Translation durch die Maskierung von mRNA oder über die Regulation der mRNA-Stabilität inhibieren (Evdokimova *et al.*, 2001; Skabkin *et al.*, 2004). YBX1 spielt außerdem im alternativen Spleißen eine Rolle (Stickeler *et al.*, 2001). Aufgrund dieser multifunktionalen Eigenschaften sind unterschiedliche Regulationsmöglichkeiten in der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation möglich, die durch weitere Untersuchungen noch untersucht werden müssen.

Es ist bekannt, dass YBX1 an der Förderung der Proliferation beteiligt ist. Dies wird über eine transkriptionelle Regulation von für die DNA Replikation relevanter Gene, wie PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), DNA-Topoisomerase IIa und DNA-Polymerase α ermöglicht (Ladomery und Sommerville, 1995; Kohno *et al.*, 2003). In der Regulation des Zellzyklus wurde YBX1 als Förderer der Proliferation, als spezifischer Aktivator der Cyclin A- und Cyclin B1-

Expression identifiziert (Jurchott *et al.*, 2003). Die Regulation der Proliferation von mesenchymalen Zellen sowie von Chondrozyten der Wachstumsfuge sind elementare Schritte der Chondrogenese (Roark und Greer, 1994; Jin *et al.*, 2007) und der enchondralen Ossifikation (Karaplis *et al.*, 1994; Weir *et al.*, 1996; Akiyama *et al.*, 2002). Eine MIA/CD-RAP gesteuerte Regulation der Proliferationsinhibition während der Chondrogenese konnte in dieser Dissertation, über die YBX1 vermittelte Aktivierung der p54^{nrb}-Transkription, bereits gezeigt werden. Aufgrund der genannten direkten Einflüsse von YBX1 auf die Proliferation sind noch weitere Wege denkbar, wie YBX1 diese in der Chondrogenese beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MIA/CD-RAP die chondrogene mesenchymale Kondensation über eine Inhibition der Proliferation von mesenchymalen Zellen fördert. Bei der Differenzierung von kondensierten mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten kommt es desweiteren zu einer Veränderung der Kollagen-Expression von Typ I (Col1a1) zu Typ II (Ede, 1983; Kravis und Upholt, 1985; Kosher *et al.*, 1986). Neben der in dieser Dissertation gezeigten MIA/CD-RAP vermittelten Aktivierung der Kollagen Typ II-Expression wäre noch eine weitere YBX1 und somit MIA/CD-RAP gesteuerte Regulation in der Chondrozytendifferenzierung denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass YBX1 an den Promotor des *Col1a1*-Gens bindet und dessen Transkription inhibiert. Eine Überexpression von YBX1 in Nierenfibroblasten führte zu einer Verminderung der Kollagen Typ I mRNA- und Proteinexpression. Auch in weiteren Zelltypen, wie die des Ovars, embryonalen Fibroblasten (3T3) und fötalen Herzfibroblasten sorgte die Überexpression von YBX1 bis zu einer 80 %igen Repression der *Col1a1*-Promotoraktivität (Norman *et al.*, 2001). Aufgrund des mesenchymalen Ursprungs von Fibroblasten (Pittenger *et al.*, 1999; Bellini und Mattoli, 2007) ist es gut möglich, dass in mesenchymalen Zellen die Kollagen Typ I-Expression während der Chondrogenese auch durch YBX1 inhibiert wird. Dies müsste durch weitere Experimente bestätigt werden.

MIA/CD-RAP aktiviert somit nicht nur die Expression von Kollagen Typ II, sondern könnte noch zusätzlich über eine Regulation der YBX1-Aktivität die Expression von Kollagen Typ I inhibieren, was ebenfalls die Chondrogenese fördern würde.

4.2.5 Mögliche Wege der YBX1-Aktivierung durch MIA/CD-RAP

Im Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung und nukleäre Translokation von YBX1 hauptsächlich durch eine über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelte Phosphorylierung von YBX1 an Serin 102 kontrolliert wird (Sutherland *et al.*, 2005). Die Zerstörung der AKT Phosphorylierungs-Stelle inhibiert die Translokation von YBX1 in den Zellkern und verhindert die Bindung an die Promotoren von bestimmten Zielgenen (Sutherland *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Basaki *et al.*, 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie ergab, dass die S102 Phosphorylierung und nukleäre Translokation von YBX1 auch mit der Progression des

Melanoms steigt. Hier konnte gezeigt werden, dass der MAPK und PI3/AKT-Signalweg zu einer Erhöhung der S102 Phosphorylierung von YBX1 führt, wobei der NFκB-Signalweg die Phosphorylierung hemmt (Sinnberg *et al.*, 2012).

Es ist bekannt, dass MIA/CD-RAP den MAPK-Signalweg in Melanomzellen über eine direkte Bindung an Integrin alpha 4 beta 1 und alpha 5 beta 1 reguliert. Diese Interaktion inhibiert spezifisch die Integrinaktivität und führt damit zu einer Hemmung der Integrinsignaltransduktion, über die Hemmung der ERK-Aktivität (Bauer *et al.*, 2006). Auch in Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass der MAPK/ERK-Signalweg durch MIA/CD-RAP inhibiert wird. Dies ist über eine Bindung von MIA/CD-RAP an Integrin alpha 5 vermittelt, was zu dessen Inaktivierung führt (Schubert *et al.*, 2010). Wie in der vorliegenden Dissertation gezeigt wurde, führte die Unterbrechung des MAPK-Signalweges, per spezifischer Inhibition der ERK1/2-Aktivität in mesenchymalen Zellen, jedoch zu keiner Regulation der p54^{nrb}-Expression, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene. Eine Regulation der p54^{nrb}-Expression durch den MIA/CD-RAP gesteuerten ERK-Signalweg konnte somit ausgeschlossen werden. Der intrazelluläre Signalweg, der die Aktivierung der p54^{nrb}-Expression durch MIA/CD-RAP über YBX1 erklärt, bleibt bisweilen ungeklärt, da im Moment keine weiteren MIA/CD-RAP regulierten Signalwege bekannt sind. Das Aufdecken dieses Mechanismus wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um zu klären, wie MIA/CD-RAP die YBX1-Aktivität erhöht.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt werden, dass die Induktion der p54^{nrb}-Expression durch MIA/CD-RAP auf transkriptioneller Ebene über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors YBX1 gesteuert wird. Es wurde somit ein großer Schritt zum Verständnis der Förderung der Chondrogenese durch MIA/CD-RAP via p54^{nrb} gemacht. Diese neuen Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese schaffen neue Ausgangspunkte, um zu erklären, wie MIA/CD-RAP seine Rolle in der Chondrogenese erfüllt. Das hier erstmalig in der Knorpelentwicklung beschriebene Molekül YBX1 ist dabei von großer Bedeutung, um weitere MIA/CD-RAP regulierte Zielgene zu identifizieren. Die zugrundeliegenden Signalwege sowie die Mechanismen, wie MIA/CD-RAP die YBX1 Phosphorylierung steuert, sind dabei noch unbekannt und sollen in weiterführenden Studien aufgeklärt werden.

4.3 Redundante Mechanismen in der Chondrogenese von MIA-knockout-Mäusen

Es besteht eine enge Korrelation der MIA/CD-RAP-Expression mit dem Beginn der Chondroblastendifferenzierung, welche während der kompletten Entwicklung zu Chondrozyten vorhanden bleibt (Dietz und Sandell, 1996; Bosserhoff *et al.*, 1997b). Ebenso belegen *in vitro*

Untersuchungen an primären Chondrozyten, dass die MIA/CD-RAP-Expression beginnt, sobald die Differenzierung in dedifferenzierten Chondrozyten einsetzt (Bosserhoff und Buettner, 2003). MIA/CD-RAP konnte somit eine eindeutige Rolle in der Chondrogenese zugewiesen werden.

Interessanterweise ist die MIA-*knockout*-Maus lebensfähig, entwickelt sich normal und zeigt neben ultrastrukturellen Störungen in der Organisation der Knorpelmatrix keine auffälligen Fehlbildungen (Moser *et al.*, 2002). Aufgrund der spezifischen Expression von MIA/CD-RAP in der Chondrogenese und der im Rahmen dieser Dissertation erlangten Kenntnisse zur Rolle von MIA/CD-RAP während dieses Prozesses *in vitro*, wurde von einem redundanten Mechanismus ausgegangen, der den Verlust von MIA/CD-RAP in der Entwicklung ausgleicht. Die Rolle von MIA/CD-RAP im Prozess der enchondralen Ossifikation der embryonalen Wachstumsfuge wurde bis jetzt noch nicht untersucht und ist Gegenstand des dritten Teilabschnitts der vorliegenden Dissertation.

4.3.1 Die enchondrale Ossifikation in MIA-*knockout*-Mäusen ist durch eine erhöhte Chondrozytenproliferation und eine verzögerte Differenzierung gekennzeichnet

Die Untersuchung der enchondralen Ossifikation in den Oberschenkelknochen von MIA-*knockout*-Mausembryonen ergab an Tag 15,5 der Embryonalentwicklung einen vergrößerten Bereich an Col2a1- und Sox9-exprimierenden proliferierenden Chondrozyten zusammen mit einem verminderten Bereich an Col10a1-exprimierenden hypertrophen Chondrozyten. Diese erhöhte Sox9-Expression sowie eine erhöhte Sox6-Expression konnte ebenfalls *in vitro* in murinen mesenchymalen Stammzellen, isoliert aus MIA-*knockout*-Mäusen, gezeigt werden. Diese Daten zeigten somit eine Fehlregulation der hypertrophen Differenzierung in MIA-*knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, gekennzeichnet durch eine erhöhte Proliferation von Chondrozyten sowie eine Verminderung der Hypertrophie. Dies scheint durch eine Fehlregulation der Transkriptionsfaktoren Sox9 und Sox6 in MIA-*knockout*-Embryonen gesteuert zu sein.

Von Sox9 ist bereits bekannt, dass es die Chondrozyten der Wachstumsfuge in Proliferation hält und die hypertrophe Differenzierung hemmt (Akiyama *et al.*, 2002), was den Phänotyp an Tag 15,5 der Embryonalentwicklung von MIA-*knockout*-Mäusen erklärt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Effekte auf eine Regulation des Hauptregulators der hypertrophen Differenzierung, dem Transkriptionsfaktor Runx2, zurückzuführen sind (Inada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001). Runx2 initiiert die hypertrophe Differenzierung im Rahmen der enchondralen Ossifikation und steuert dabei den vollständigen Ablauf dieser Entwicklung in Chondrozyten (Stricker *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005). Runx2 reguliert die

Transkription der folgenden Markergene der terminalen Differenzierung (Hypertrophie): MMP-13 (Collagenase-3) (Jimenez *et al.*, 1999) und Col10a1 (Enomoto *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003; Higashikawa *et al.*, 2009). MMP13 ist für den Umbau der Knorpelmatrix verantwortlich, da es die Hauptbestandteile der Knorpel-EZM, Kollagen Typ II (Inada *et al.*, 2004) und Aggrecan (Fosang *et al.*, 1996) abbaut. Die Ablagerung von Kollagen Typ X in die EZM dient als Gerüst und als Regulator der schrittweisen Mineralisierung (Shen, 2005). Da in dieser Arbeit kein Unterschied in der Runx2-mRNA-Expression zwischen den Wildtyp und MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden konnte, kann die beschriebene Inhibition der Runx2-Transkription durch Sox9 ausgeschlossen werden (Lengner *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2009). Sox9 kann jedoch die transkriptionelle Aktivität von Runx2-Protein auch über eine direkte Interaktion inhibieren (Zhou *et al.*, 2006), was die verlängerte Proliferation und verzögerte Hypertrophie in MIA-*knockout*-Embryonen erklären würde. Ein weiterer Mechanismus, wie die erhöhte Sox9- und Sox6-Expression an Tag 15,5 der Embryogenese in MIA-*knockout*-Mäusen, was zu einer Erhöhung der Proliferation und Verzögerung der Hypertrophie beiträgt, ist die Regulation der PTHrP-Expression. PTHrP ist ein von Chondrozyten an den Enden der wachsenden Röhrenknochen exprimiertes und sekretiertes Signalmolekül, welches durch Diffusion parakrin auf PTH/PTHrP Rezeptor tragende Chondrozyten wirkt (Amizuka *et al.*, 1996). Es sorgt dafür, dass Chondrozyten in Proliferation gehalten werden und inhibiert deren hypertrophe Differenzierung (Karaplis *et al.*, 1994; Lanske *et al.*, 1996; Weir *et al.*, 1996) in einem gut untersuchten negativen Feedbackmechanismus zusammen mit Ihh (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). Sox9 und Sox6 aktivieren zusammen die PTHrP-Promotoraktivität (Amano *et al.*, 2009), was eine Beteiligung des PTHrP/Ihh Feedbackmechanismus in der Entwicklung von MIA-*knockout*-Embryonen wahrscheinlich macht. PTHrP inhibiert die hypertrophe Differenzierung über eine Inhibition der Runx2-Expression (Iwamoto *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2006; Provot *et al.*, 2006; Kozhemyakina *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt, war die Runx2-mRNA-Expression nicht durch MIA/CD-RAP reguliert. Somit ist eine Beteiligung der PTHrP-abhängigen Regulation der Runx2-Expression an der verminderten Hypertrophie in MIA-*knockout*-Embryonen unwahrscheinlich. Die Aktivierung der PTHrP gesteuerten Proliferation könnte jedoch eine Erklärung für die erhöhte Zahl an proliferierenden Chondrozyten in 15,5 Tage alte MIA-*knockout*-Embryonen sein. PTHrP aktiviert den Zellzyklus über eine Aktivierung der Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und Cyclin A (Beier *et al.*, 2001; Beier und LuValle, 2002). Cyclin D1 fördert hierbei den Verlauf der G1 Phase des Zellzyklus und Cyclin A den Fortschritt der späten Phase (Beier *et al.*, 1999). Außerdem fördert PTHrP die Chondrozytenproliferation über eine Inhibition der p57-Expression. P57 ist ein Hemmer von Cyclin-abhängigen Kinasen, die zusammen mit Cyclinen wichtige regulatorische Rollen im Zellzyklusverlauf einnehmen (Zhang *et al.*, 1997; MacLean *et al.*, 2004). Obwohl der Transkriptionsfaktor Ap-2 α als negativer Regulator der

Chondrozytendifferenzierung bekannt ist, konnte auch eine Erhaltung der Sox9-mRNA-Expression gezeigt werden (Huang *et al.*, 2004). Somit würde die in dieser Arbeit gezeigte erhöhte Expression von Ap-2 α in MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen zur Stabilisierung der Sox9-Überexpression beitragen.

Zusammenfassend konnte somit ein markanter Phänotyp während der enchondralen Ossifikation in MIA-*knockout*-Mäusen beschrieben werden, der von einer erhöhten Proliferation und verminderten hypertrophen Differenzierung gekennzeichnet war. Dieser Phänotyp wurde durch eine erhöhte Sox9- und Sox6-Expression ausgelöst. Diese Ergebnisse bestätigen die unter Punkt 4.1 beschriebene erhöhte Proliferation von MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen und MIA-defizienten Chondrozyten.

4.3.2 Die verminderte p54^{nrb}-Expression in MIA-defizientem Gewebe wird kompensiert

Das in dieser Arbeit als Vermittler von MIA/CD-RAP agierende, identifizierte Protein p54^{nrb} ist ein wichtiger Faktor in der Sox9-regulierten Transkription. P54^{nrb} interagiert mit Sox9, erhöht dessen transkriptionelle Aktivität und ist darum als Teil des Sox9-Transkriptionskomplexes beschrieben (Hata *et al.*, 2008). Obwohl eine direkte Interaktion von Sox6 und Sox9 bis jetzt noch nicht gezeigt werden konnte (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre, 2002), ist Sox6 ein weiteres Mitglied des Sox9-Transkriptionskomplexes, welches die Sox9-abhängige Transkription fördert (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die in dieser Dissertation bereits beschriebene Verminderung der p54^{nrb}-Expression in Gewebe von MIA-*knockout*-Mäusen für die Überexpression von Sox6 und Sox9 in der Chondrogenese von MIA-*knockout*-Mäusen verantwortlich ist. Eine Analyse von MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen in denen p54^{nrb} überexprimiert wurde, zeigten in der Tat verminderte mRNA-Expressionsmengen an Sox9 und Sox6. Somit konnte die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Sox9 und Sox6 als ein redundanter Mechanismus identifiziert werden, der die reduzierte Aktivität des Sox9-Transkriptionskomplexes aufgrund der verminderten p54^{nrb}-Expression in MIA-defizienten Zellen kompensiert.

Die verlängerte Proliferation und verminderte hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten der Wachstumsfuge von MIA-*knockout*-Embryonen an Tag 15,5 der Entwicklung konnte somit auf einen redundanten Mechanismus zurückgeführt werden, ausgelöst durch eine verminderte p54^{nrb}-Expression. Dies führte zu einer Überkompensation der Sox9- und Sox6-Expression, was zu dem beobachteten Phänotyp in MIA-*knockout*-Mausembryonen führte. Hingegen war p54^{nrb} nicht an der Überexpression von Ap-2 α beteiligt, was auf einen anderen Mechanismus verschieden von p54^{nrb} schließen lässt.

Eine redundante Regulation konnte auch bei einem weiteren wichtigen Molekül der Knorpelentwicklung, dem Integrin alpha 10, gezeigt werden (Bengtsson *et al.*, 2005). Das von Chondrozyten exprimierte Integrin alpha 10 interagiert mit der Integrin beta 1 Untereinheit und ist wohl das bedeutendste kollagenbindende Molekül (Camper *et al.*, 1998; Camper *et al.*, 2001). Die Integrin alpha 10-Expression beginnt an Tag 11,5 der Embryonalentwicklung, am selben Zeitpunkt an dem die Chondrogenese beginnt. Nach der Geburt wird Integrin alpha 10 in Chondrozyten des Gelenksknorpels und der Wachstumsfuge exprimiert (Camper *et al.*, 2001). Immunhistochemische Analysen der Integrin alpha 10-Expression an 3 Tage alten Mäusen zeigten eine Expression im Gelenksknorpel, der Wirbelsäule und der Luftröhre (Camper *et al.*, 2001). Die Integrin alpha 10-*knockout*-Maus zeigte jedoch, wie die MIA-*knockout*-Maus, nur einen milden Phänotyp. Sie entwickelt eine Wachstumsverzögerung der Röhrenknochen, hat aber eine normale Lebenserwartung und ist fruchtbar (Bengtsson *et al.*, 2005). Eine Analyse des Skeletts konnte Defekte in der Wachstumsfuge nach der Geburt ausmachen. Diese sind durch eine gestörte Anordnung der säulenartigen Chondrozyten, eine anormale Chondrozytenform und eine verminderte Chondrozytenproliferation charakterisiert (Bengtsson *et al.*, 2005). Integrin alpha 10 beta 1 ist somit wichtig aber nicht essentiell für die enchondrale Ossifikation. Es wird vermutet, dass andere kollagenbindende Integrine, wie Integrin alpha 1 beta 1 und alpha 2 beta 1 den Verlust von Integrin alpha 10 kompensieren (Bengtsson *et al.*, 2005).

4.3.3 L-Sox5 hat keinen Einfluss auf die Redundanz in der Chondrogenese von MIA-*knockout*-Mäusen

L-Sox5 und Sox6 werden mit Sox9 während der gesamten Chondrogenese koexprimiert (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). L-Sox5 und Sox6 erfüllen dabei in Zusammenarbeit mit Sox9 eine entscheidende Rolle in der Chondrogenese, indem sie die Differenzierung zu Chondrozyten vermitteln und die hypertrophe Differenzierung verhindern. L-Sox5 und Sox6 fördern die Differenzierung von Chondroblasten, indem sie in Zusammenarbeit mit Sox9 die Expression von knorpelspezifischen Genen, wie *Col2a1* und *Aggrecan* aktivieren (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). Darüber hinaus aktivieren L-Sox5 und Sox6 zusammen mit Sox9 über eine direkte Bindung und Aktivierung des *PTHrP*-Promotors die *PTHrP*-Expression und halten dadurch Chondrozyten in Proliferation und hemmen deren hypertrophe Differenzierung (Amano *et al.*, 2009). L-Sox5 und Sox6 fördern somit in Zusammenarbeit mit Sox9 die schrittweise Reifung der Chondrozyten der Wachstumsfuge und sind damit essenziell für die Ausbildung des enchondralen Skeletts.

In der hier untersuchten Chondrogenese von MIA-*knockout*-Mäusen konnte jedoch nur eine gemeinsame Überexpression von Sox9 und Sox6 nachgewiesen werden. Die Expression von

L-Sox5 in MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen war unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Wie Studien an Sox5 und Sox6-*knockout*-Mäusen ergaben, ist jedoch die Expression von L-Sox5 oder Sox6 ausreichend, um eine normale Entwicklung des Skeletts mit nur wenigen Fehlbildungen zu erzielen (Smits *et al.*, 2001). Sox5/Sox6 doppel-*knockout*-Mäuse hingegen entwickeln schwere, generalisierte Chondrodysplasien mit praktisch keiner Ausbildung von echtem Knorpel und sterben an Herz- oder Kreislaufversagen an Tag 16,5 der Embryogenese (Smits *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass L-Sox5 und Sox6 redundante Funktionen in der Chondrogenese haben und erst das Fehlen von beiden Proteinen sich auf die Knorpelentwicklung auswirkt. Wie anhand der Chondrogenese von MIA-*knockout*-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, ist auch hier die Überexpression von Sox6 und Sox9 offensichtlich ausreichend.

Ein weiterer Aspekt, der dafür spricht, dass Sox6 und Sox9 alleine ausreichend sind, um ihre Rolle in der Chondrogenese zu erfüllen, sind die Ergebnisse aus den Analysen des Sox9-Transkriptionskomplexes. Die Sox-Transkriptionsfaktoren binden an das 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' Konsensus-Motiv (Harley *et al.*, 1994) in der kleinen Furche der DNA und führen damit zur Biegung der DNA (Connor *et al.*, 1994), was die Bindung der RNA-Polymerase ermöglicht und letztendlich die Transkription initiiert (van de Wetering und Clevers, 1992). L-Sox5 und Sox6 besitzen im Vergleich zu Sox9 keine Transaktivierungsdomäne, dafür aber neben einer DNA-Bindedomäne eine *coiled-coil*-Domäne (Lefebvre *et al.*, 1998), welche die Ausbildung von L-Sox5/Sox6-Protein Homo- und Heterodimeren ermöglicht (Lefebvre *et al.*, 1998). L-Sox5 und Sox6 spielen somit eine architektonische Rolle in der Ausbildung des Sox9-Transkriptionskomplexes, indem sie als Homo- und Heterodimer an die DNA binden, diese biegen und damit eine effizientere Transkription durch Sox9 ermöglichen. Eine alleinige Überexpression von Sox6 und Sox9, wie in MIA-defizienten Zellen gezeigt wurde, ist aber trotzdem ausreichend um die Sox9-abhängige Transkription zu aktivieren, da Sox6-Moleküle auch Homodimere ausbilden (Takamatsu *et al.*, 1995) und diese eine Biegung der DNA auslösen (Lefebvre *et al.*, 1998). Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien von Amano und Kollegen in denen gezeigt wurde, dass Sox6 zusammen mit Sox9 die PTHrP-Promotoraktivität auch ohne Sox5 stärker aktiviert als Sox9 alleine (Amano *et al.*, 2009).

4.3.4 Sox9 ist der Hauptmediator der Redundanz in MIA-*knockout*-Mäusen

Inaktiviert man das Sox9-Gen mit einem Cre/*loxP*-Rekombinations-System in Mäusen spezifisch vor der mesenchymalen Kondensation, kommt es zu einem Verlust der L-Sox5- und Sox6-Expression. Auch beim Ausschalten des Sox9-Gens nach der mesenchymalen Kondensation, kommt es zu einer starken generalisierten Chondrodysplasie vergleichbar mit den beobachteten Fehlbildungen in Sox5/Sox6 doppel-*knockout*-Mäusen (Akiyama *et al.*,

2002). In Sox5/Sox6 doppel-*knockout*-Mäuse konnte jedoch gezeigt werden, dass die Menge an exprimierter Sox9-mRNA mit der in Wildtyp-Knorpel vergleichbar ist (Smits *et al.*, 2001). Zusammen mit *in vitro* Experimenten, in denen humane mesenchymale Stammzellen mit Sox9 behandelt wurden, bestätigen diese Ergebnisse, dass Sox9 die Expression von L-Sox5 und Sox6 induziert (Ikeda *et al.*, 2004). L-Sox5 und Sox6 liegen somit *downstream* von Sox9, werden aber erst nach der mesenchymalen Kondensation induziert. L-Sox5 und Sox6 hingegen induzieren sich nicht gegenseitig (Ikeda *et al.*, 2004).

In der modulierten Chondrogenese von MIA-*knockout*-Mäusen ist somit Sox9 der Hauptmediator der Redundanz, da die Überexpression von Sox6 sehr wahrscheinlich auf eine Aktivierung von Sox9 zurückzuführen ist.

4.3.5 Die Regulation der AP1- und CREB-Aktivität ermöglicht eine normale Entwicklung von MIA-*knockout*-Mäusen

Interessanterweise zeigte die weitere Analyse des Prozesses der enchondralen Ossifikation in MIA-*knockout*-Embryonen bei 16,5 Tage alten Embryonen einen vergrößerten Bereich an hypertrophen Chondrozyten im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen. Es konnte eine Vergrößerung des Bereichs an hypertrophen Chondrozyten um den Faktor 1,6 von Tag 15,5 zu Tag 16,5 in MIA-*knockout*-Embryonen relativ zu Wildtyp-Embryonen beobachtet werden. Diese Daten zeigten, dass die verlängerte Chondrozytenproliferation und die verminderte Hypertrophie der Chondrozyten der Wachstumsfuge an Tag 15,5 der Embryogenese an Tag 16,5, durch eine erhöhte hypertrophe Differenzierung ausgeglichen wurde. Es handelt sich somit hierbei um einen weiteren redundanten Mechanismus, der die normale Knochenentwicklung ermöglicht und zu einem so gut wie normal entwickelnden Skelett in adulten MIA-*knockout*-Mäusen führt (Moser *et al.*, 2002). Um zu klären, wie die erhöhte hypertrophe Differenzierung von proliferierenden Chondrozyten in MIA-*knockout*-Embryonen an Tag 16,5 vermittelt wurde, wurde die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP response element-binding protein) und AP1 (Activator protein 1) im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es handelt sich dabei um zwei beschriebene Vermittler der PTHrP-Signaltransduktion in der Chondrogenese (Ionescu *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2001a). Es konnte eine Verminderung der AP1- und CREB-Aktivität in MIA-defizienten mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden, was für Vorgänge an Tag 16,5 der Chondrogenese verantwortlich sein könnte.

CREB-*knockout*-Mäuse zeigen Minderwuchs und sterben kurz nach der Geburt aufgrund von Atemnot (Rudolph *et al.*, 1998). Es handelt sich hierbei um einen Phänotyp, der auch in Sox9- (Bi *et al.*, 2001), L-Sox5- und Sox6- (Smits *et al.*, 2001) sowie Runx2-*knockout*-Mäusen (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997) beobachtet werden konnte. Die Expression eines dominant negativen CREB-Inhibitors in Chondrozyten der Wachstumsfuge führt ebenfalls zu verkürzten

Extremitäten, was auf eine Verminderung der Chondrozytenproliferation zurückzuführen war (Long *et al.*, 2001a). Eine weitere Studie betont die Rolle von CREB während der enchondralen Ossifikation. Eine Inhibition der CREB Funktion führte zu einer Verminderung der Chondrozytenproliferation und zu einer Verstärkung der hypertrophen Differenzierung (Ionescu *et al.*, 2001), was den hier gemachten Beobachtungen an Tag 16,5 der Entwicklung in MIA-*knockout*-Mäusen entspricht. PTHrP vermittelt die CREB Phosphorylierung und Aktivierung durch die Aktivierung von PKA (Protein kinase A) und zum Teil auch durch die Aktivierung von PKC (Protein kinase C) (Ionescu *et al.*, 2001). Die Induktion der AP1-Aktivität wird durch eine PKA vermittelte erhöhte Expression der AP1 Untereinheit c-Fos gesteuert (Ionescu *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass die PTHrP vermittelte Aktivierung von CREB die Runx2-Expression auf mRNA- und Proteinebene hemmt, was zu einer Verminderung der hypertrophen Differenzierung führt (Ionescu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004a). Ein ähnlicher Effekt konnte für AP1 gezeigt werden. Hier führt die Aktivierung von AP1 zu einer Verminderung der Kollagen Typ X-Expression, einem Marker für hypertrophe Chondrozyten (Ionescu *et al.*, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte verminderte CREB- und AP1-Aktivität in MIA-defizienten Zellen kann somit die verstärkte hypertrophe Differenzierung von 16,5 Tage alten MIA-*knockout*-Embryonen durch eine positive Regulation der Runx2-Expression erklären. Dies führt schließlich zu einer normalen Entwicklung des Skeletts (Moser *et al.*, 2002). In Chondrozyten führt CREB außerdem zu einer Aktivierung der Promotoraktivität der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 (Beier *et al.*, 2001; Ionescu *et al.*, 2001; Beier und LuValle, 2002) und Cyclin A (Beier und LuValle, 2002). Dies würde einen weiteren Mechanismus darstellen, wie die Inhibition der CREB-Aktivität die Redundanz an Tag 16,5 der Entwicklung von MIA-*knockout*-Embryonen vermittelt werden kann. Eine Proliferationsinhibition würde die Reifung von proliferierenden zu postmitotischen hypertrophen Chondrozyten fördern. Da eine Verstärkung der Sox9-Aktivität durch eine direkte Interaktion mit CREB bekannt ist (Zhao *et al.*, 2009), könnte die verminderte CREB-Aktivität in MIA-*knockout*-Mäusen die Sox9 Funktion vermindern und somit die hypertrophe Differenzierung noch auf einen posttranslationalen Weg fördern.

Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass die Chondrogenese in MIA-*knockout*-Mäusen aufgrund des p54^{nrb}-Verlustes stark moduliert ist. Es kommt zu einem redundanten Mechanismus an Tag 15,5, indem der p54^{nrb}-Verlust durch eine Überexpression von Sox9 und Sox6 ausgeglichen wird. Letztendlich ermöglicht die Verminderung der CREB- und AP1-Aktivität in MIA-*knockout*-Embryonen an Tag 16,5 sehr wahrscheinlich die normale Weiterentwicklung. In der Knorpelentwicklung von MIA-*knockout*-Embryonen kommt es somit an mehreren Punkten zu einer redundanten Regulation, welche die weitgehend normale Entwicklung von MIA-*knockout*-Mäusen zulässt.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Bezugsquellen von allgemeinen Materialien, Chemikalien und Enzymen

Hersteller, Firmensitz	Produkt
Abcam, Cambridge, England	Monoklonaler anti-Cyclin D2 Antikörper (Klon DCS-3.1)
Active Motif, Carlsbad, USA	ChIP-IT [®] Control qPCR Kit-Human, ChIP-IT [®] Express Enzymatic kit
AppliChem GmbH, Darmstadt	Acrylamid Lösung 40 %, Levamisol-Hydrochlorid, Proteinase K, Ribonukleinsäure aus Hefe (t-RNA)
Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	pAP1-Luc Vektor, pCRE-Luc Vektor, QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit
BD Biosciences, Mississauga, Kanada	anti-p54 [nrb] Antikörper (Klon 3/p54nrb), BD Atlas [™] Glass Hybridization Chambers, BD Falcon [™] 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes für Luciferase Assay und FACS Analyse, ITS [™] Premix
Bio-Rad, München	Precision Plus Protein [™] Standards Kaleidoscope [™] , Sequi-Blot [™] PVDF Membran 0,2 µm Porengröße
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	Biozym LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua ad iniectionabilia, Injekt [®] -Einmalspritzen steril
Calbiochem, San Diego, USA	PD98059, UO126
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Agar, Ethanol, Ethidiumbromid, RNase AWAY [™] , Roti [®] -Load 1 4x konzentriert (reduzierend), Roti [®] -Phenol/C/I, Serologische Pipetten 10 ml (steril)
Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA	anti-mouse IgG AP-gekoppelter Antikörper, anti-rabbit IgG AP-gekoppelter Antikörper, Monoklonaler anti-Phospho-YB1 (Ser102) (C34A2) Antikörper, Polyklonaler anti-YB1 (D299) Antikörper
Corning Inc., Corning, USA	500 ml Bottle Top Filter 0,2 µm, Corning [®] Flask: 25, 75 und 175 cm ² Cell Culture Flask, Costar [®] 6- und 96-Well Cell Culture Plate
Dako North America Inc., Carpinteria, USA	Antibody Diluent with Background Reducing Components, ARK [™] (Animal Research Kit) Peroxidase for Mouse Primary Antibodies, Monoklonaler anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Antikörper (Klon PC10)
Eppendorf, Hamburg	Combitips advanced [®]
Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Oligonukleotide (siRNA)
FEATHER [®] Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan	FEATHER [®] Disposable Scalpel No. 11

Fermentas Life Sciences, Burlington, Kanada (Thermo Fisher Scientific Inc.)	RiboLock™ RNase Inhibitor, SP6-, T3- und T7-RNA Polymerase, 5x Transcription Buffer
Fine Science Tools Inc., Vancouver, Kanada	Pinzetten und Scheren
GE Healthcare, Buckinghamshire, UK	Amersham Hyperfilm™ HP, illustra™ Nick™ Columns Sephadex™ G-50 DNA Grade
Genaxxon BioScience GmbH, Ulm	dNTP-Set
Gilson® Inc., Middleton, USA	Spitzen für Gilson Pipetman® Neo: Diamond® Eco-Pack™ D10, 100, 1000; Diamond® Pure Performance Tips DL10, D200, DF1000ST (sterilized)
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich	Cellstar® Tubes 15 und 50 ml, CRYO.S™ mit Schraubverschluss
HumanZyme Inc., Chicago, USA	Recombinant Human TGF-β3
ImaGenes, Berlin	pCMV-SPORT6-hp54 ^{nrb} Vektor
Invitrogen™, Carlsbad, USA (Life Technologies™ Inc.)	BCIP/NBT Kit, Lipofectamine® 2000 Reagent, Lipofectamine® Reagent, Lipofectamine® RNAiMAX, MEM Vitamin Solution (100x), pCR®II-TOPO® Vektor, Plus™ Reagent, SuperScript® II Reverse Transcriptase, TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter, TrackIt™ 100 bp, 1 kb und 1 kb Plus DNA Ladder
KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht- Elsenroth	Gewebe-Einbettkassetten Biopsie
Kimberly-Clark, Dallas, USA	Kimtech Science Brand Green Nitrile Powder-Free Gloves (PPE Kategorie III)
Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen	Glas-Deckgläser, Glas-Objektträger
Life Technologies™ Inc., Carlsbad, USA	Geneticin ^R (G-418 Sulfate)
Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz	Human MSC Nucleofector® Kit
Merck KGaA, Darmstadt	Ammoniumacetat, Isopropanol, Methanol, Natriumacetat
Merck Millipore, Billerica, USA	Kaisers Glyceringelatine
New England Biolabs, Ipswich, USA	T4 DNA Ligase und Reaktionspuffer, NEB 10-beta Competent <i>E.coli</i> (High Efficiency), Restriktionsendonukleasen und NEBuffer/BSA
Nunc A/S, Roskilde, Dänemark	96-Well Platten (transparent) für BCA-Messungen
Omega Bio-Tek Inc., Norcross, USA	E.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit, E.Z.N.A.® Total RNA Kit I
PAA Laboratories Inc, Dartmouth, USA	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin/Streptomycin (100x), Phosphate Buffered Saline (PBS), Trypsin/EDTA (10x)
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS)
Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA	Parafilm® M
Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen	Precellys Keramik-Kit
PerkinElmer, Waltham, USA	[γ- ³² P]-dATP, 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml

Promega, Mannheim	Bacterial Strain <i>E. coli</i> BMH 71-18 <i>mutS</i> (Non-Competent), Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System, Erase-a-Base [®] System, Konsensus Oligonukleotide für AP1 und CREB, Nuklease-freies Wasser, pGL2basic Vektor, pGL3basic Vektor, pGL4.10[<i>luc2</i>] Vektor, pRL-TK Vektor
Qiagen, Hilden	HiPerFect [®] Transfection Reagent, HiSpeed [®] Plasmid Midi Kit, Negative control siRNA, Oligonukleotide (siRNA), QIAamp [®] DNA Mini Kit, QIAquick [®] Gel Extraction Kit, siRNAs
Qualilab, Olivet, Frankreich	Qualifreeze Cryo-Einfriergerät
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Blocking Reagent für <i>in situ</i> Hybridisierung, BM Purple AP Substrate precipitating, Cell Proliferation Kit II (XTT), cOmplete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, DIG RNA Labeling Mix, dN6 Primer, LightCycler [®] Capillaries (20 µl), LightCycler [®] MultiWell Plate 96 (white), LightCycler [®] 480 Sealing Foil, LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master, Polynukleotidkinase- und Puffer, RIPA Puffer, RNase A, Taq DNA Polymerase
SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht	Petrischale 92x16mm mit Nocken
SCHOTT AG, Mainz	Erlenmeyerkolben, Glasflaschen, Glasküvetten
Sigma-Aldrich [®] Corp., St. Louis, USA	Acrylamid Lösung 30 %, Ampicillin, Amphotericin B, APS, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 5 M Betaine PCR Reagent, 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU), Bromphenolblau, BSA, Chloroform, 2'-Deoxycytidin (DC), Dexamethason, D-(+) Glukose Lösung 45 %, Diethylpyrocarbonat, DMSO, DTT, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ohne Phenolrot/Natriumbicarbonat für XTT, Hefeextrakt, Hoechst 33258, IGEPAL CA-630, 2-Mercaptoethanol, 3-Methyl-1-butanol, Monoklonaler anti-β-Aktin Antikörper (Klon AC-15), Natriumbicarbonat, Natriumchlorid, Natriumpyruvat, NP-40, Poly(dI-dC), Oligonukleotide (EMSA, Primer, siRNA), Prolin, Propidiumiodid, SDS, TEMED, Trizma [®] base, Trypton, Tween20, Xylencyanol und alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität
TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR [®] Premix Ex Taq [™] (Perfect Real Time)
Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	Pierce [®] BCA Protein Assay Kit, Superfrost [®] Plus Objektträger
Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	1,5 und 2 ml Mikroreaktionsgefäße
VWR, Darmstadt	Sterile Syringe Filter 0,2 µm Cellulose Acetate Membrane
Whatman International Ltd., Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier

5.1.2 Geräte, Apparaturen und Software

Gerät/Apparatur	Hersteller, Firmensitz	Bezeichnung
Autoklaven	Fedegari Autoklaven AG, Bedano, Schweiz	Autoklav FNR 9325E
Blotapparaturen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Trans-Blot [®] SD Semi-Dry Transfer Cell
Brutschränke	Heraeus Instruments, Hanau (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	CO ₂ -Inkubator HeraCell 240
Gelelektrophorese-Apparaturen	Biometra [®] , Göttingen	Minigel-Twin Typ G42
	Bio-Rad, München	Wide Mini-Sub [®] Cell GT
	International Biotechnologies Inc., New Haven, USA	Variable Comb Vertical Gel Electrophoresis Unit Model VCV
Heiz- und Kühlblöcke	BIOER Technology, Hangzhou, China	CHB-202 Thermocell Cooling and Heating Block, Mixing Block MB-102
	Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermo-mixer comfort
	Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, Bielefeld	TR-L288
Mikroskope	Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim	DM IL Type 090-135.001
	Carl Zeiss, Jena	Axiovert 10, Axiovert 200, HAL100, AxioCam MRc
Pipetten und Pipettierhilfen	BD Biosciences, Mississauga, Kanada	BD Falcon™ Bench-Top Pipet-Aid™ Express Pipet-Aid
	Eppendorf, Hamburg	Multipette [®] plus, Multipette [®] stream
	Gilson [®] Inc., Middleton, USA	Pipetman [®] Neo P10N, P100N, P1000N
Schüttler	Biometra [®] , Göttingen	Taumelschüttler - WT17
	BioSan Ltd., Riga, Lettland	Wippschüttler - Mini-Rocker Shaker MR-1
	GFL [®] Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel	Kreisschüttler - 3015
	IKA-Labortechnik, Staufen	Kreisschüttler - IKA-Vibrax VXR
	VWR International, Radnor, USA	Überkopfschüttler - Tube Rotator H5600
Spannungsgeräte	Bio-Rad, München	PowerPac™ HC, Model 200/2.0 Power Supply
	Consort, Turnhout, Belgium	Microcomputer Electrophoresis Power Supply E455
	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK	Electrophoresis Power Supply EPS301, -1001
	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	BluePower™ 500 Power Supply
Sterilwerkbänke	Heraeus Instruments, Hanau (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	HeraSafe KS18, LaminAir [®] HLB2448GS, -HB2448

Thermocycler	MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	LightCycler® II, LightCycler® 480
Waagen	Sartorius, Göttingen	L2200S, R160P
Wasserbäder	JULABO Labortechnik, Seelbach	SW-20C
	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sontheim vor der Rhön	Assistent® WTE 3185
	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	W200
Wärmeschränke	Heraeus Instruments, Hanau (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	B6060, T6120
	BINDER GmbH, Tuttlingen	Typ 3511
	UVP® Laboratory Products, Upland, USA	HB-1000 Hybridizer
Vakuumpumpen	Hoefer® Inc., Holliston, USA	Membranpumpe VP200
	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim	Membranpumpe Typ MD4C, MZ2C
Zentrifugen	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen	Rotina 380R
	Eppendorf, Hamburg	MiniSpin Plus, Zentrifuge 5810R, 5415C, -D, -R
	Heraeus Instruments, Hanau (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	Biofuge 13, Biofuge 22R, Biofuge pico, Megafuge 1.0
	Labnet International Inc., Edison, USA	Minifuge™ C1200
	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen	Mikroliterzentrifuge Z100M
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	LC Carousel Centrifuge
Sonstige Geräte	Bachhofer, Reutlingen	UV-Schirm-UV-Transilluminator 254nm IL-200-K, -366nm IL-75-L
	BD Biosciences, San Jose, USA	Durchflusszytometer - LSR-II
	Berthold, München	Geigerzähler - LB122, Röhrchen Luminometer - Lumat LB9501, 9507
	Bio-Rad, München	Gelgießapparatur
	BioPhotonics® Corp., Ann Arbor, USA	Geldokumentationssystem - Gel Print 2000i
	Bosch Hausgeräte GmbH, München	Mikrowelle - HMT 812C
	DuPont, Bad Homburg	Röntgenkassette - Cronex® Lightning Plus
	Heidolph, Kehlheim	Magnetrührer - MR2000, MR2002, MR3001 Vortexer - REAX2000, REAX top
	Hoefer® Inc., Holliston, USA	Geltrockner - SLAB Gel Dryer Model GD2000
	Kodak, Rochester, USA	Entwicklermaschine - X-Omat 2000 Processor

Sonstige Geräte	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz	Nucleofector™ I Device
	Merck Millipore, Billerica, USA	Milli-Q Plus Reinstwasseranlage
	Molecular Devices, Sunnyvale, USA	Mikroplatten Leser - Emax precision
	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen	Spektralphotometer - Nanodrop® ND-1000-UV/Vis
	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden (<i>GE Healthcare</i>)	Photometer - Gene Quant II RNA/DNA Calculator
	Savant, New York, USA (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	Konzentrator - SpeedVac® SC110
	Shandon GmbH, Frankfurt am Main (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	Gewebeeinbettautomat - Hypercenter XP
	Tuttnauer/Systec, Wettenberg	Autoklav - 2540 EK
	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg	Inkubationshaube - UNIHOO
	WTW, Weilheim	pH-Meter - pH531

Hersteller, Firmensitz	Software
Adobe, San Jose, USA	Adobe® PhotoShop®
BD Biosciences, San Jose, USA	BD FACSDiva™ Software 6.1.1
Carl Zeiss, Jena	AxioVision Release 4.5
Genomatix, München	MatInspector, Gene2Promoter (www.genomatix.de)
GraphPad Software Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism® 4.03 Software
NCBI DCODE.org Comparative Genomics Developments	ECR-Browser (http://ecrbrowser.dcode.org)
Molecular Devices, Sunnyvale, USA	SoftMax® Pro Software 5.2
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	LightCycler® Software Version 3.5, LightCycler® 480 Software release 1.5.0 Version 1.5.0.39

5.1.3 Antikörper, DNA-Farbstoffe, Inhibitoren und rekombinante Proteine

Primäre Antikörper

Der primäre β -Aktin-Antikörper wurde ohne Blockierung, nur in Puffer eingesetzt. Der Puffer richtete sich dabei nach dem Puffer des Primär-Antikörpers des zuvor detektierten Proteins.

Antikörper	Wirtstier	Anwendung	Blockierung/ Puffer	Verdünnung	Hersteller, Hauptsitz
β -Aktin	Maus	Western Blot	TBST (0,1 %) bzw. PBS	1:5000	Sigma-Aldrich® Corp., St. Louis, USA
Cyclin D2	Maus	Western Blot	5 % Milch/ TBST (0,1 %)	1:200	Abcam, Cambridge, England

P54 [nrb]	Maus	Western Blot	3 % BSA/PBS	1:2000	BD Biosciences, Mississauga, Kanada
PCNA	Maus	Immunhistochemie	siehe 2.3.4.6	1:250	Dako Inc., Carpinteria, USA
Phospho-YB1 (Ser102)	Kaninchen	Western Blot	5 % Milch/ TBST (0,1 %)	1:500	Cell Signaling, Danvers, USA
YB1 (D299)	Kaninchen	Western Blot	5 % BSA/ TBST (0,1 %)	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
YBX1	Kaninchen	ChIP	direkt	1:40	Eurogentec, Liège, Belgium

Sekundäre Antikörper

Es wurden mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Sekundär-Antikörper verwendet. Die Sekundär-Antikörper wurden im jeweiligen Puffer des Primär-Antikörpers verdünnt.

Antikörper	Wirtstier	Anwendung	Puffer	Verdünnung	Hersteller; Hauptsitz
Anti-Maus IgG (AP)	Ziege	Western Blot	TBST (0,1 %) bzw. PBS	1:3000	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Hase IgG (AP)	Ziege	Western Blot	TBST (0,1 %)	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA

DNA-Farbstoffe

Farbstoff	Wirkung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller, Hauptsitz
Hoechst 33258	Der Farbstoff bindet an die kleinere Furche der DNA mit einer Präferenz für Adenin und Thymidin reiche Sequenzen. Hoechst Farbstoffe sind zellpermeabel und können somit an DNA in lebenden oder fixierten Zellen binden. Die Hoechst 33258 Fluoreszenzintensität wird durch in die DNA eingebautes BrdU reduziert (Quenching).	1,2 µg/ml	Sigma-Aldrich® Corp., St. Louis, USA
Propidiumiodid (PI)	Nukleinsäureinterkalator mit dem der DNA-Gehalte von Zellen und somit der Zellzyklus analysiert werden kann. Der Farbstoff kann intakte Membranen nicht durchdringen, nur die perforierte Zellmembran von toten Zellen. Die Fluoreszenz-intensität von PI wird nicht durch BrdU beeinflusst.	1,5 µg/ml	Sigma-Aldrich® Corp., St. Louis, USA

Inhibitoren

Inhibitor	Wirkung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller, Hauptsitz
PD98059	Inhibition der MAP Kinase Kaskade durch selektive Inhibierung der MEK1- und im geringeren Maße der MEK2-Aktivierung.	20 µM	Cell Signaling, Danvers, USA
UO126	Inhibition der MAP Kinase Kaskade durch selektive Inhibierung der MEK1- und MEK2-Aktivierung.	20 µM	Calbiochem, San Diego, USA

Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Spezies	Eingesetzte Konzentration	Hersteller, Hauptsitz
TGF-β3	Human	10 ng/ml	HumanZyme Inc., Chicago, USA

5.1.4 DNA- und Proteinstandard

Zur Bestimmung der Länge von dsDNA-Fragmenten wurden die DNA-Längenstandards TrackIt™ 100 bp, 1 kb und 1 kb Plus verwendet:

100 bp: [bp]	1 kb: [bp]	1 kb Plus: [bp]
2072	12,216	12,000
1500	⋮ 1018 bp Abstand	⋮ 1000 bp Abstand
⋮ 100 bp Abstand	2036	2000
100	1636	1650
	1018	1000
	500	850
	396	650
	344	500
	298	400
	220	300
	201	200
	154	100
	134	
	75	

Für die Abschätzung des Molekulargewichts von Proteinen wurde der Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™ verwendet:

Precision Plus Protein™ Standard [kDa]
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

5.1.5 Plasmide

pCR®II-TOPO®

Der pCR®II-TOPO® Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) ermöglicht eine direkte Klonierung von *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR Produkten ohne Zwischenschritte. Das Plasmid wird linearisiert geliefert, wobei es über einen einzelnen 3'-Thymidin (T) Überhang, sowie kovalent gebundener Topoisomerase I verfügt. Die für die PCR-Reaktionen (siehe 5.3.3.2) verwendete DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verfügt über eine Matrizen-unabhängige terminale Transferaseaktivität, durch welche sie an das 3' Ende aller generierten PCR Produkte ein einzelnes Desoxyadenosin (A) anfügt. Über die Topoisomerase I wird somit ein direktes Ligieren von PCR Produkt und Vektor möglich.

pCMX-PL1

Der pCMX-PL1 Vektor ist ein Expressionskonstrukt bestehend aus den Vektoren pUC 19 und CDM8.

Expressionskonstrukt pCMX-PL1-hMIA/CD-RAP

Zur Überexpression von MIA/CD-RAP in Zellkulturen wurde die cDNA des gesamten humanen *MIA/CD-RAP*-Gens in den pCMX-PL1 Vektor kloniert.

Expressionskonstrukt pCMV-SPORT6-hp54^{nrb}

Zur Überexpression von p54^{nrb} in Zellkulturen wurde von der Firma ImaGenes (Berlin) die cDNA des kompletten humanen p54^{nrb}-Gens (mRNA) in den pCMV-SPORT6 Vektor kloniert (Acc. No: BC028299). Die Sequenz besteht aus 2646bp und wurde mit den Restriktionsendonukleasen NotI und SalI kloniert.

pRL-TK

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bei der Durchführung von Luciferase-Reporter-Gen-Assays (siehe 5.3.5.7) wird der pRL-TK Vektor (Promega, Madison, USA) zusammen mit dem eigentlichen Reporter-Plasmid kotransfiziert. Der pRL-TK Vektor enthält ein modifiziertes Renilla-Luciferase-Gen, welches aus der Seefeder *Renilla reniformis* isoliert wurde, unter der Kontrolle eines HSV-TK (Herpes simplex Virus Thymidinkinase) Promotors. Durch Verwendung dieses Promotors wird eine schwache bis moderate Expression der Renilla-Luciferase in den kotransfizierten Säugetierzellen ermöglicht.

pGL2-/pGL3basic

Der pGL2- bzw. pGL3basic Vektor (Promega, Madison, USA) ist ein Reportervektor, der eine multiple Klonierungsstelle besitzt, in die eine zu analysierende Promotorregion insertiert werden kann. Zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des Promotors enthält der Vektor hinter der multiplen Klonierungsstelle das modifizierte Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, welches als Reporter-Gen dient.

pGL4.10[luc2]

Der pGL4.10[luc2] Vektor (Promega, Madison, USA) erfüllt dieselben Kriterien wie der pGL2- bzw. pGL3basic Vektor (siehe oben). Dieser Vektor wurde für eine hohe Reporter-Genexpression und eine verminderte Hintergrundtranskription optimiert. Es befinden sich hier weniger regulatorische Konsensus-Sequenzen im Vektor. Zudem wurde das Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* für die Expression in Mammalia optimiert.

COL2A1-Promotor-Reporterkonstrukt

Das COL2A1-Promotor Konstrukt (Col2Luc) enthält ein 702 bp langen Promotorbereich des COL2A1-Gens welches vor das Luciferase-Reporter-Gen des pGL2basic Vektors kloniert wurde. Der Bereich reicht von -577 bis +125 bp relativ vor (-) bzw. nach (+) dem Transkriptionsstart. Das Konstrukt wurde von Linda J. Sandell (Department of Orthopaedic Surgery, Washington University, St. Louis, USA) zur Verfügung gestellt (Tan *et al.*, 2003).

P54^{nrb}-Promotor-Reporterkonstrukte

Um den *p54^{nrb}*-Promotor in Luciferase-Reporter-Gen-Assays zu untersuchen, wurden ausgewählte genomische Bereiche des humanen (h) und murinen (m) *p54^{nrb}*-Gens per Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primern (siehe 5.1.6) amplifiziert und in den pGL4.10[*luc2*] Luciferase Expressionsvektor (Promega Corp., Madison, WI, USA) mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und EcoRV ligiert (siehe 5.3.3.7). Die folgenden Promotor-Reporterkonstrukte wurden generiert: hp54^{nrb}Luc -8436 bis -6833 bp und mp54^{nrb}Luc -9160 bis -7461 bp relativ vor dem Translationsstart.

Die Mutationen im *hp54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukt von -7079 bis -7038 bp wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese durchgeführt (siehe 5.3.3.8). Es wurde ein Austausch von jeweils drei Nukleotiden innerhalb der beiden relevanten Transkriptionsfaktor-Konsensusbindestellen vorgenommen.

YBX1-Promotor-Reporterkonstrukt

Das YBX1-Promotor-Reporterkonstrukt (YBX1Luc) enthält den Promotor des YBX1-Gens, welcher vor einem Luciferase-Reporter-Gen des pGL3basic Vektors kloniert wurde. Das Konstrukt wurde von Dr. Per S. Holm (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar, München) zu Verfügung gestellt (Holm *et al.*, 2002).

AP1-Reporter-Plasmid

Der pAP1-Luc Reportervektor (AP1Luc) wurde von der Firma Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA) aus dem PathDetect® in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting System bezogen. Das Plasmid enthält sieben hintereinander klonierte AP1 Enhancer Elemente (**TGACTAA**)₇ vor einem Luciferase-Reporter-Gen.

CRE-Reporter-Plasmid

Der pCRE-Luc Reportervektor (CRELuc) wurde ebenfalls von der Firma Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA) aus dem PathDetect® in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting System bezogen. Das Plasmid enthält vier hintereinander klonierte CRE Enhancer Elemente (AGCCT**GACGTC**AGAG)₄ vor einem Luciferase-Reporter-Gen.

YBX1-Reporter-Plasmid

Der YBX1-Luc Reportervektor (YBX1Luc II) enthält vier hintereinander liegende Y-box-Konsensus-DNA-Bindestellen (CTGATTGGCTAA)₄, welche vor einem Luciferase-Reporter-Gen des pGL3basic Vektors kloniert wurden. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Kiyoshi

Higashi (Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Company, Ltd., Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt (Higashi *et al.*, 2003).

pm2a1-1 RNA Sonde

Ein Teil der 3'-UTR der murinen Col2a1 cDNA Sequenz wurde über HindIII und EcoRI in den pBluescript KS(-) Vektor kloniert. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus von der Mark (Nikolaus Fiebiger Zentrum für Molekulare Medizin, Experimentelle Medizin I, Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen) zur Verfügung gestellt.

pmCol10a1-1 RNA Sonde

Ein Teil der 3'-UTR der murinen Col10a1 cDNA Sequenz wurde in den pCR®-Blunt II-TOPO® Vektor kloniert. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus von der Mark zur Verfügung gestellt.

mSox9 RNA Sonde

Ein Teil des 3. Exons der murinen Sox9 cDNA Sequenz wurde über HindIII und EcoRI in den Bluescript KS(+/-) Vektor kloniert. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Véronique Lefebvre (Department of Cellular and Molecular Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, USA) zur Verfügung gestellt.

5.1.6 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA) in lyophilisierter Form bezogen. Nach Lösen in ddH₂O wurden diese als 100 µM Stammlösungen bei -20 °C gelagert. In Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) wurden die entsprechenden Primer-Paare in einer Konzentration von 20 µM eingesetzt.

Genomische Primer für die Klonierung unterschiedlicher p54^{nrb}-Promotor-Reporterkonstrukte

Für die Ligation in den pGL4.10[*luc2*] Vektor (siehe 5.1.5) wurden an das 5' Ende der Forward Primer jeweils eine XhoI Restriktionsschnittstelle (grau hinterlegt) (5'-GAC C/TCGAG-3') und an das der Reverse Primer eine EcoRV Restriktionsschnittstelle (grau hinterlegt) (5'-GAC GAT/ATC-3'), abgeschlossen von einer GAC Sequenz, angefügt. Zur Anfertigung der Primer wurde die genomische Sequenz des *p54^{nrb}*-Gens von der Datenbank der National Center for Biotechnology Information (NCBI) als Vorlage bezogen (Referenzsequenz Human: NC_000023.10, Maus: NC_000086.6). Die Annealingtemperatur zur Amplifizierung der

humanen *P54NRB* (*NONO*) Promotor-Fragmente betrug 64 °C, die des murinen *P54nrb* (*Nono*) Promotor-Fragments 62 °C. Die Lage des amplifizierten Genomabschnittes (**XYZ**) relativ zum Translationsstart (**ATG**) des *p54^{nrb}*-Gens ist wie folgt definiert: *P54NRB* (Human): **XYZATG** (A = 70510487 bp \pm +1, Z \pm -1); *P54nrb* (Maus): XYZATG (A = 98632556 bp \pm +1, Z \pm -1)

Gen	Spezies	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	Produktgröße [bp]	Lage im Genom [bp]	Lage relativ vor (-) dem Translationsstart [bp]
<i>NONO</i> (<i>P54NRB</i>)	Human	5'-GCGCGATCTCCACTCATTGCAG-3'/ 5'-TTCGCCCTAGCCTCTTCCTTCG-3'	1604	70502051- 70503654	-8436 bis -6833
		5'-TTTTTCTCCTCTCCTTTCC-3'/ 5'-TTCGCCCTAGCCTCTTCCTTCG-3'	532	70503123- 70503654	-7364 bis -6833
		5'-GTCTCTCCTTCCGACCCCA-3'/ 5'-TTCGCCCTAGCCTCTTCCTTCG-3'	468	70503187- 70503654	-7300 bis -6833
		5'-GCGGTCGCGCGCTCTTTTCT-3'/ 5'-TTCGCCCTAGCCTCTTCCTTCG-3'	164	70503491- 70503654	-6996 bis -6833
		5'-TTTCTCGGGACGGGAGAGGC-3'/ 5'-TTCGCCCTAGCCTCTTCCTTCG-3'	149	70503506- 70503654	-6981 bis -6833
<i>Nono</i> (<i>P54nrb</i>)	Maus	5'-TGCTGAGCCATCTCTCCAGTCC-3'/ 5'-GGCCACAGTTCTTTGCTCGGAG-3'	1700	98623396- 98625095	-9160 bis -7461

Genomische Primer für Genotypisierung

Gen	Spezies	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	Annealingtemperatur [°C]	Produktgröße [bp]	NCBI Referenzsequenz
<i>Mia</i> /Wildtyp	Maus	5'-ATCCTATCTCCATGGCTGTGG-3'/ 5'-GCCACTTTTGATGGTTTGCTG-3'	58	396	NC_000073.6
<i>Mia</i> /K.O.	Maus	5'-CTGCTCTTTACTGAAGGCTCT-3'/ 5'-CCCATCAGCCTCACCGTAGGT-3'	58	396	n.v.

Primer für Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

LightCycler® 480:

Die Annealingtemperatur für die Primerpaare Sox5 und Sox6 (jeweils Maus) betrug 62 °C. Alle restlichen Primer wurden bei 60 °C annealt. Die Effizienz (E) und die Messtemperatur (M) wurde für jedes Primerpaar gesondert bestimmt.

Gen	Spezies	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	E/M [°C]	Produktgröße [bp]	NCBI Referenzsequenz
<i>ACTB</i>	Human	5'-CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC-3'/ 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'	2,003/ \leq 86	384	NM_001101
<i>CEBPG</i>	Human	5'-CGGTTGAAAAGCAAGCAGAAAGCA-3'/ 5'-GATCCAGAAAATAGCTCCAATG-3'	2/ \leq 81	350	NM_001806

<i>HOXC5</i>	Human	5'-TGGATGACCAAAGTGCACATGAGC-3'/ 5'-CAAGTTGTTGGCGATCTCTATGCG-3'	2/ ≤ 84	149	NM_018953
<i>MEIS1</i>	Human	5'-AAGGTGATGGCTTGGACAA-3'/ 5'-GGCTGCACTATTCTTCTCCG-3'	2/ ≤ 82	259	NM_002398
<i>MIA</i>	Human	5'-CATGCATGCGGTCTATGCCCAGCTG-3'/ 5'-GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC-3'	1,96/ ≤ 87	324	NM_006533
<i>NFIA/ Nfia</i>	Human/ Maus	5'-TGGCATACTTTGTACATGCAGC-3'/ 5'-ACCTGATGTGACAAAGCTGTCC-3'	2/ ≤ 81	128	NM_001134673/ NM_001122952
<i>NFIB/ Nfib</i>	Human/ Maus	5'-CCACAGTGATCCTGCCAAGAA-3'/ 5'-GGAAATGGCAACGGTGAGGGC-3'	2/ ≤ 82	519	NM_001190737/ NM_001113209
<i>NFIC/ Nfic</i>	Human/ Maus	5'-GACCTGTACCTGGCCTACTTTG-3'/ 5'-CACACCTGACGTGACAAAGCTC-3'	2/ 87	147	NM_005597/ NM_008688
<i>NFIX/ Nfix</i>	Human/ Maus	5'-CTGGCTTACTTTGTCCACACTC-3'/ 5'-CCAGCTCTGTCACATTCCAGAC-3'	2/ ≤ 82	148	NM_001271043/ NM_001081982
<i>PBX1</i>	Human	5'-CCACGTGATGAATCTCCTGCGAGAG-3'/ 5'-TCACTGTATCCTCCTGTCTGGCTGA-3'	2/ ≤ 85	626	NM_002585
<i>YBX1</i>	Human	5'-GGGACAAGAAGGTCATCGCA-3'/ 5'-GTAACATTTGCTGCCTCCGC-3'	1,93/ 80	228	NM_004559
<i>Actb</i>	Maus	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'/ 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	1,9/ ≤ 85	320	NM_007393
<i>Cebpg</i>	Maus	5'-ACGTGCCCAAATGAGCAAGC-3'/ 5'-CTGAGGAACCTGCTGTAAGC-3'	2/ ≤ 81	108	NM_009884
<i>Hoxc5</i>	Maus	5'-TGGATGACCAAAGTGCACATGAGC-3'/ 5'-GCAGGGACCACAGCAGACCG-3'	2/ ≤ 83	292	NM_175730
<i>Meis1</i>	Maus	5'-CAGTCACCAACAATGATTAATCAGCTG-3'/ 5'-CACTCAGTTAACCTTATATGCATGCCA-3'	2 / 78-81	388	NM_010789
<i>Mia1</i>	Maus	5'-CCAAGCTGGCTGACTGGAAG-3'/ 5'-GCCAGGTCTCATAGTAACC-3'	1,944/ ≤ 84	207	NM_019394
<i>Nono (P54nrb)</i>	Maus	5'-GGCTTTGGCTTTATTCGCTTG-3'/ 5'-TCCATAGGCTCCACAGTCAC-3'	2/ 82-85	356	NM_023144
<i>Pbx1</i>	Maus	5'-TCATGATCCTGCGCTCCCGGTTCTGGAT-3'/ 5'-TGATGCCCTGCGGACTGTACATCTGACTG-3'	2/ 84-85	529	NM_183355
<i>Runx2</i>	Maus	5'-GGAACCAAGAAGGCACAGAC-3'/ 5'-AAGTCAGAGGTGGCAGTGTC-3'	2,154/ 81-86	371	NM_001145920
<i>Sox5</i>	Maus	5'-ATGCTTACTGACCCTGATTT-3'/ 5'-TCTCCTCCTCTTCCACTTTC-3'	1,976/ ≤ 82	130	NM_011444
<i>Sox6</i>	Maus	5'-CGATTTACCAGTGACTTCTG-3'/ 5'-CCCTCTTCCTTTCCCTTGA-3'	1,817/ ≤ 82	146	NM_011445
<i>Sox9</i>	Maus	5'-CTCTGGAGGCTGCTGAACGAGAGC-3'/ 5'-TTCTTCACCGACTTCCTCCGCCG-3'	2,033/ 84-86	127	NM_011448
<i>Tfap2a</i>	Maus	5'-CCAACAGCAATGCTGTCTCCG-3'/ 5'-GCGACGCGTTAAGACACTCGG-3'	2,217/ 82-86	188	NM_011547
<i>Tfap2e</i>	Maus	5'-GCCGACCCTGGGGAGCTACAC-3'/ 5'-CACCTCCGGCGCCGCTTAAA-3'	2,29/ ≤ 86	282	NM_198960

LightCycler® II:

Die Annealing- (A) und die Messtemperatur (M) wurde für jedes Primerpaar gesondert bestimmt. Humanes und murines β -Aktin wurde bei den jeweiligen Annealing- und Messtemperaturen des zu untersuchenden Gens gemessen.

Gen	Spezies	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	A/M [°C]	Produktgröße [bp]	NCBI Referenzsequenz
<i>NONO (ChIP)</i>	Human	5'-TTTGTCCCATCTGTCGTTCA-3'/ 5'-CGACCGCCGGAACGAGA-3'	64/78	191	NC_000023.10
<i>Actb</i>	Maus	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'/ 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	-/-	320	NM_007393
<i>Ccnd2</i>	Maus	5'-AAGGAGGTAAGGGAAGCACTC-3'/ 5'-GAAATAGGAACACTGCGGGAG-3'	58/86	228	NM_009829
<i>Col2a1</i>	Maus	5'-CTACTGGAGTGACTGGTCCTAAGG-3'/ 5'-GGACCATCATCTCCAGGTTCTCC-3'	66/84	262	NM_001113515
<i>Mia1</i>	Maus	5'-CCAAGCTGGCTGACTGGAAG-3'/ 5'-GCCAGGTCTCATAGTAACC-3'	64/86	207	NM_019394
<i>Nono (P54^{nrb})</i>	Maus	5'-GGCTTTGGCTTTATTCGCTTG-3'/ 5'-TCCATAGGCTCCACAGTCAC-3'	58/85	356	NM_023144

Primer für Mutagenese

Die ausgetauschten Nukleotide sind grau hinterlegt. Mut I: TGG gegen **ATC** ausgetauscht → neue EcoRV Schnittstelle entstanden; Mut II: GAT gegen **CCA** ausgetauscht → neue NcoI Schnittstelle entstanden. Die Mutation wurde jeweils in das humane *p54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukt -7079 bis -6833 bp eingefügt.

Gen	Spezies	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (forward/reverse)
<i>NONO (P54^{NRB})</i>	Human	-7079 Mut I	5'-CATTTCTCTGGCCTTGAT ATC CAGTTTAGCTAACCAATCGAG-3'/ 5'-CTCGATTGGTTAGCTAAACTGG AT ATCAAGGCCAGAGAAATG-3'
		-7079 Mut II	5'-CATTTCTCTGGCCTT CCAT GGCAGTTTAGCTAACCAATCGAG-3'/ 5'-CTCGATTGGTTAGCTAAACTGCCAT GGA AAGGCCAGAGAAATG-3'

Oligonukleotide für EMSA

Die Oligonukleotide für EMSA-Assays wurden ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA) in lyophilisierter Form bezogen, in ddH₂O als 100 μ M Stammlösungen bei -20 °C gelagert und in einer Konzentration von 20 μ M verwendet. Die mutierten Nukleotide sind grau hinterlegt. Mut I: TGG gegen **ATC** ausgetauscht; Mut II: GAT gegen **CCA** ausgetauscht.

Gen	Spezies	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (forward/reverse)
<i>NONO</i> (<i>P54NRB</i>)	Human	5'-hp54 ^{nrb}	5'-TCTGGCCTTGATTGGCAGTTTAG-3'/ 5'-CTAAACTGCCAATCAAGGCCAGA-3'
		3'-hp54 ^{nrb}	5'-CTAACCAATCGAGAACGCCATTTT-3'/ 5'-AAAATGGCGTTCTCGATTGGTTAG-3'
		5'-hp54 ^{nrb} Mut I	5'-TCTGGCCTTGATATCAGTTTAG-3'/ 5'-CTAAACTGGATATCAAGGCCAGA-3'
		5'-hp54 ^{nrb} Mut II	5'-TCTGGCCTTCCATGGCAGTTTAG-3'/ 5'-CTAAACTGCCATGGAAGGCCAGA-3'

Transkriptionsfaktor-Konsensus-Oligonukleotide

Die Transkriptionsfaktor-Konsensus-Oligonukleotide wurde von der Firma Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, USA) in gelöster Form bezogen (1,75 pmol/μl) und bei -20 °C gelagert.

Transkriptionsfaktor	Nukleotidsequenz (forward/reverse)
AP1	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'/ 5'-TTCCGGCTGACTCATCAAGCG-3'
CREB	5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3'/ 5'-CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT-3'

small interfering RNAs (siRNAs)

Small interfering RNA (siRNA) gegen murines Mia wurde von der Firma Sigma-Aldrich® synthetisiert, nach Erhalt in RNase-freiem ddH₂O auf 100 μM gelöst und bei -20 °C gelagert. Die siRNA gegen humanes YBX1 wurde von Tobias Sinnberg entworfen (Sinnberg *et al.*, 2012) und von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt. Alle anderen siRNAs wurden von der Firma Qiagen bezogen und nach Lösen in RNase-freiem ddH₂O als 20 μM Stammlösungen ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Gen	Spezies	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (sense/antisense)	NCBI Referenzsequenz
n.v.	keine	siRNA negativ Kontrolle	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'/ 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3'	keine
<i>MIA</i>	Human	Hs_MIA_7	5'-CAGACAAAUGGGAUUUCUATT-3'/ 5'-UAGAAAUCCCAUUUGUCUGTC-3'	NM_006533
<i>Mia1</i>	Maus	Mm_MIA_20-43	5'-CAGGUUUCCUUGAUUUCAGC-3'/ 5'-GCUGAAUAUCAAGGAAACCUG-3'	NM_019394
<i>Nono</i>	Maus	Mm_Nono_3	5'-GCGGCAUCACCUUAUUAATT-3'/ 5'-UUUAAUAAGGUGAUGCCGCAT-3'	NM_023144
<i>YBX1</i>	Human	Hs_YBX1	5'-AGUUCAAGGCAGUAAAUAU-3'/ 5'-AUUUUUACUGCCUUGAACU-3'	n.v.

5.1.7 *Escherichia coli* Bakterienstämme

Hersteller, Firmensitz	Bezeichnung	Stamm	Verwendung
Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Super-Competent <i>E. coli</i>	XL1-Blue	Mutagenese (siehe 5.3.3.8)
Invitrogen™, Carlsbad, USA (Life Technologies™ Inc.)	One Shot® Chemically-Competent <i>E. coli</i>	TOP10F'	TOPO TA Cloning® (siehe 5.3.3.7)
New England Biolabs, Ipswich, USA	NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i>	DH10B	Nested deletion und Klonierung (siehe 5.3.3.8)
Promega, Mannheim	Non-Competent <i>E. coli</i>	BMH 71-18 <i>mutS</i>	Retransformation (siehe 5.3.1.3)

5.1.8 Säugetierzelllinien

Humane Melanomzelllinien	Herkunft, Beschreibung
HMB2	aus einer Melanommetastase
HMB2 -MIA5	Humane Melanomzelllinie HMB2, stabil transfiziert mit einem antisense MIA Konstrukt (Klon 5)
HMB2 -MIA8	Humane Melanomzelllinie HMB2, stabil transfiziert mit einem antisense MIA Konstrukt (Klon 8)
HMB2 <i>lacZ</i>	Humane Melanomzelllinie HMB2, stabil transfiziert mit einem β -Galaktosidase (<i>lacZ</i>) Expressionskonstrukt
Mel Ei	aus einem Primärtumor
Mel Im	aus einer Melanommetastase
Mel Ju	aus einer Melanommetastase
Mel Juso	aus einem Primärtumor, (DSMZ-Nr.: ACC74)

Murine Melanomzelllinie	Herkunft, Beschreibung
B16-F10	n.v.

Primäre murine Zellen	Herkunft, Beschreibung
Mesenchymale Stammzellen	isoliert aus dem Knochenmark (mMSC: murine mesenchymale Stammzellen)

5.1.9 Mäuse

Die *MIA-knockout*- (*MIA*^{-/-}) Mauslinie wurde auf einen C57BL/6 Hintergrund durch Einbringen eines PGK/Neomycin-Konstruktes in das *MIA*-Gen generiert. Durch die Insertion wurden Teile von Exon 2 sowie Exon 3 und 4 komplett deletiert, wodurch kein aktives MIA-Protein exprimiert werden kann (Moser *et al.*, 2002).

5.2 Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen

5.2.1 Medien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Lysogeny Broth (LB)-Medium nach Miller	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	Für Agarplatten: Zugabe von 15 g/l Agar
	Zur Selektion: Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin

Die Substanzen wurden in ddH₂O gelöst und autoklaviert. Für Agarplatten wurde noch zusätzlich Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Für die Selektionierung auf Antibiotikaresistenz wurde zu dem autoklavierten LB-Medium bzw. dem abgekühlten LB-Agar Ampicillin zugegeben.

5.2.2 Medien zur Anzucht von Säugetierzellen

Medium zur Anzucht von humanen und murinen Melanomzelllinien:	DMEM; 10 % (v/v)
	FKS; 100 U/ml
	Penicillin; 100 µg/ml
	Streptomycin

Medium zur Anzucht von murinen MSC:	DMEM, 0,3 % D-(+) Glukose, 20 % (v/v)
	FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml
	Streptomycin, 0,4 % MEM Vitamine,
	500 ng/ml Amphotericin-B

Medium zur Anzucht von murinen MSC: für Proliferations-Assay (XTT)	10 g/l DMEM Pulver ohne Phenolrot
	3,7 g/l Natriumbicarbonat

Die Substanzen wurden in ddH₂O gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und 0,2 µm sterilfiltriert. Anschließend wurden die für die Anzucht von murinen MSC nötigen Zusätze (siehe oben) ergänzt. DMEM ohne Phenolrot wurde

für die Durchführung von Proliferationsanalysen im XTT anstatt von normalem DMEM verwendet.

Medium zur Differenzierung von murinen MSC: DMEM, 0,3 % D-(+) Glukose, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,4 % MEM Vitamine, 500 ng/ml Amphotericin-B, 0,17 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 0,1 µM Dexamethason, 1 mM Natriumpyruvat, 0,35 mM Prolin, 5 mg/l Insulin, 5 mg/l Transferin und 5 µg/l Selenige Säure (ITS™ Premix)

Das Medium wurde 0,2 µm sterilfiltriert.

Einfriermedium für humane und murine Zellen: 50 ml DMEM [mit 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin]
30 ml FKS
20 ml DMSO

5.2.3 Antibiotika und Antimykotika

Bezeichnung	Stammlösung	Lagerung
Ampicillin	50 mg/ml in ddH ₂ O, 0,2 µm sterilfiltriert	-20 °C
Geneticin ^R	100 mg/ml in ddH ₂ O, 0,2 µm sterilfiltriert	-20 °C
Penicillin/Streptomycin	10000 Units/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin, steril	-20 °C
Amphotericin-B	250 µg/ml, steril	-20 °C

5.2.4 Puffer und Lösungen

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x): 2 M Tris/Acetate (pH 8,0); 50 mM EDTA

Agarosegel: 1-2 % (w/v) Agarose, gelöst in TAE (1x)

DNA-Gel-Ladepuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol;
40 % (v/v) Saccharose

Ethidiumbromidlösung: 0,04 % (w/v) in ddH₂O

Lösungen für die Zellkultur

PBS (steril): PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA

Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Lösung I: 50 mM Glukose
25 mM Tris/HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA

Lösung II: 0,2 M NaOH
1 % (w/v) SDS

Lösung III: 3 M Kaliumacetat
11,5 % (v/v) Eisessig

Lösungen und Gele für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer für SDS-PAGE: 25 mM Tris/HCl (pH 8,5); 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

12,75 % Trenngel: 31,25 % (v/v) Acrylamid (40 % Stammlösung)
37,5 % (v/v) Tris/HCl (1 M, pH 8,8)
0,1 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) APS
0,1 % (v/v) TEMED

4 % Sammelgel: 10 % (v/v) Acrylamid (40 % Stammlösung)
12 % (v/v) Tris/HCl (1 M, pH 6,8)
0,1 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) APS
0,1 % (v/v) TEMED

Lösungen für Western Blot

Blotpuffer: 10 % (v/v) Methanol; 25 mM Tris; 190 mM Glycin

PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
mit HCl auf pH 7,4 einstellen,
autoklavieren

TBST: 150 mM NaCl; 100 mM Tris; 0,1 % (v/v) Tween20
mit HCl auf pH 7,5 einstellen,
autoklavieren

Blockierungslösungen: 3 % (w/v) BSA in PBS oder 5 % (w/v) Milchpulver in TBST

Puffer für BrdU/Hoechst Quenching

DNA-Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 7,4
154 mM NaCl
1 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂
0,2 % (w/v) BSA (kurz vor Gebrauch zugeben)

DNA-Färbepuffer: DNA-Waschpuffer
0,1 % (w/v) IGEPAL CA-630
40 µg/ml RNase A
1.2 µg/ml Hoechst 33258

Puffer für Isolation von Kernproteinen

Kernprep Lysispuffer I: 10 mM HEPES pH 7,9
10 mM KCl
0,1 mM EDTA pH 8,0
0,1 mM EGTA pH 8,0

Kernprep Lysispuffer II:	20 mM HEPES pH 7,9
	400 mM NaCl
	1 mM EDTA pH 8,0
	1 mM EGTA pH 8,0

Lösungen und Gel für Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 mM EDTA
	mit HCl auf pH 7,5 einstellen

TBE (10x):	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM EDTA pH 8,0

EMSA-Bindepuffer (5x):	25 mM HEPES pH 7,8
	250 mM KCl
	25 mM MgCl ₂
	1 mM EDTA
	50 % Glycerin
	25 mM DTT

EMSA-Ladepuffer:	80 % Formamid
	10 mM NaOH
	1 mM EDTA
	0,1 % Xylencyanol
	0,1 % Bromphenolblau

4,5 %-Polyacrylamidgel:	15 % (v/v) Acrylamid (30 % Stammlösung)
	1,875 % (v/v) TBE (10x)
	0,0375 % (w/v) APS
	0,1 % (v/v) TEMED

Lösungen zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysat)

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 % (w/v) Nonidet® P40; 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; cOmplete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail

Puffer für die Immunhistochemie

Citrat-Puffer: 10 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
mit HCl auf pH 6,0 einstellen

Puffer für die *in situ* Hybridisierung

Alle Puffer wurden in sterilen Gefäßen (4 Stunden bei 200 °C) angesetzt. Für die Herstellung der Puffer wurden ausschließlich sterile, RNase freie Spitzen und Einmalpipetten, sterile Spatel und DEPC behandeltes bzw. autoklaviertes ddH₂O verwendet. Alle Puffer, bis auf PE (10x) und NTM wurden nach Herstellung autoklaviert. Etwaige RNase-Kontaminationen auf Oberflächen und Geräte wurden mit RNase AWAY™ entfernt.

Färbelösung: BM Purple
2 mM Levamisol
0,1 % (v/v) Tween20

Hybridisierungspuffer: 62,5 % (v/v) Formamid
0,9 M NaCl
12,5 % (v/v) PE (10x)
1,25 % (w/v) BSA
1,25 % (w/v) SDS
0,0625 % (w/v) Heparin
0,0125 % (w/v) tRNA

MAB: 100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

MABT: 0,1 % (v/v) Tween20 in MAB

NTE:	0,5 M NaCl 10 mM Tris/HCl pH 7,0 5 mM EDTA pH 8,0
NTM:	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl pH 9,5 50 mM MgCl ₂
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 einstellen
PE (10x):	100 mM PIPES pH 6,8 10 mM EDTA pH 8,0
Proteinase K Puffer:	20 mM Tris/HCl pH 7,2 1 mM EDTA pH 8,0
SSC (20x):	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
TBST:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2,5 mM Tris/HCl pH 7,4 0,1 % (v/v) Tween20
Tris/Glycin-Puffer:	0,1 M Tris 0,1 M Glycin
Sonstige Lösungen	
RNase A Lösung:	10 mM Tris/ HCl pH 7,0; 10 mg/ml RNase A

5.3 Methoden

Sämtliche Arbeiten mit *Escherichia Coli*, alle Molekularbiologischen- und Zellkulturarbeiten fanden unter Verwendung steriler Gefäße und sterilen Lösungen statt. Alle Zellkulturarbeiten wurden zusätzlich unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperatur angegeben ist, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.3.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

5.3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* BMH 71-18

Für die Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*) BMH 71-18 wurde die CaCl_2 Methode verwendet. Zunächst wurden 40 ml LB-Medium mit 0,4 ml einer *E. coli* BMH 71-18 Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD bei 650 nm von 0,2-0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde fünf Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 2000 min^{-1} (775 g) und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 20 ml 50 mM CaCl_2 Lösung resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 2000 min^{-1} und 4 °C wurde das Pellet vorsichtig in 4 ml 50 mM CaCl_2 Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Glycerin wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.3.1.2 Kultivierung

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurde der jeweilige transformierte *E.coli* Stamm (siehe 5.1.7) auf festen Nährboden (LB-Agarplatten siehe 5.2.1) sowie in flüssiger Schüttelkultur (LB-Medium siehe 5.2.1) kultiviert. Das eingeführte Plasmid trug dabei ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien wurde dem Flüssigmedium bzw. der Nährplatte das Selektionsantibiotikum Ampicillin zugesetzt. Die transformierte Bakteriensuspension wurde mit Hilfe eines sterilen Trigalsky Spatels auf LB-Agarplatten ausplattiert. Schüttelkulturen wurde durch Picken einer Einzelkolonie von der Nährplatte mit einer sterilen Spitze angeimpft. Die Inkubation der Platten erfolgte für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank, die der Flüssigkulturen bei 37 °C im Schüttler bei 250 min^{-1} .

5.3.1.3 Transformation

Für die Transformation von Plasmiden in *E.coli* wurde die entsprechende Menge an Plasmid-DNA (bei Retransformationen: 100 ng Plasmid-DNA) zu der entsprechenden Menge auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien gegeben (siehe unten bzw. 5.1.7). Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen für 30 bis 60 Sekunden (je nach Stamm siehe unten) einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu erzielen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt, pro Ansatz 500 µl LB-Medium hinzu gegeben und die Kultur 60 Minuten bei 37 °C und 300 min⁻¹ geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde anschließend 5 min bei 4000 min⁻¹ (1.500 g) abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbliebenen Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Bakteriensuspension erfolgte auf LB-Agarplatten versetzt mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin. Die Platte wurde für 16 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Verwendung (siehe)	Hitzeschock	<i>E. coli</i> Stamm	Bakterienmenge	DNA-Menge
Mutagenese (5.3.3.8)	45 s 42 °C	XL1-Blue	50 µl	1 µl Ligationsansatz
Retransformation	60 s 42 °C	BMH 71-18	100 µl	100 ng
Nested deletion (5.3.3.8)	30 s 42 °C	DH10B	50 µl	Kompletter Ansatz
Klonierung (5.3.3.7)	30 s 42 °C	DH10B	50 µl	Kompletter Ansatz
TOPO TA Cloning® (5.3.3.7)	30 s 42 °C	TOP10F'	50 µl	2-4 µl PCR-Produkt

5.3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Midi-Präparation)

Mini-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowicz und Burke, 1981). Für die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA (bis 5 µg, Mini-Präparation) wurden 3 ml steriles LB Medium, versetzt mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum, mit einer Einzelkolonie von der LB-Agarplatte angeimpft und 16 Stunden bei 37 °C und 250 min⁻¹ auf dem Bakterienschüttler herangezogen. Die Bakterien aus 1ml der Flüssigkultur wurden 5 min bei 4000 min⁻¹ (1.500 g) pelletiert und das Bakterienpellet in 100 µl Lösung I (siehe 5.2.4) resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 200 µl Lösung II (siehe 5.2.4) zur Lyse der Bakterien zugegeben und das Gefäß zur Durchmischung vorsichtig invertiert. Dieser Schritt ermöglichte die spätere Abtrennung der Plasmid-DNA von Proteinen und chromosomaler DNA: Proteine wurden durch das in Lösung II enthaltene SDS und chromosomale DNA (nicht jedoch superhelikale Plasmid-DNA) wurde durch das alkalische Milieu denaturiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl der

Lösung III (siehe 5.2.4) und eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Da denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und Membranbestandteile nach Zugabe der kaliumacetathaltigen Lösung III unlösliche Komplexe mit dem entstehenden Kaliumdodecylsulfat bildeten, konnten sie mittels Zentrifugation für 5 min bei 13.000 min^{-1} (15.700 g) aus der Lösung entfernt werden. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und mit $900 \mu\text{l}$ reinem Ethanol gefällt. Dazu wurde der Ansatz zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend das Präzipitat 10 min bei 13.000 min^{-1} abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen und das Plasmid-DNA Pellet im SpeedVac® SC110 Konzentrator zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in $20 \mu\text{l}$ eines RNase Mixes ($120 \mu\text{l}$ ddH₂O + $5 \mu\text{l}$ RNase A) resuspendiert und im Heizblock für 20 Minuten bei 37°C und 300 min^{-1} geschüttelt, um störende, niedermolekulare RNA aus dem Präparat zu entfernen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

Midi-Präparation

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis $250 \mu\text{g}$, Midi-Präparation) wurden 50 ml steriles LB-Medium, versetzt mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum, in einem Erlenmeyerkolben angesetzt. Der Ansatz wurde mit $50 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension aus einer Vorkultur angeimpft und 16 Stunden bei 37°C auf dem Schüttelinkubator herangezogen. Die eigentliche Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung des HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen entsprechend der beiliegenden Anleitung. Die Plasmid-DNA wurde mit $500 \mu\text{l}$ H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

Die Konzentration von gelöster DNA wurde im Gene Quant II RNA/DNA Photometers bestimmt (siehe 5.3.3.5).

5.3.2 RNA-Methoden

5.3.2.1 Isolierung von RNA

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde der E.Z.N.A.® Total RNA Kit I bzw. für kleinere Zellmengen von höchstens 5×10^5 Zellen der E.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit verwendet. Die Zellkulturen wurden zunächst mit PBS gewaschen, im Falle der Kultivierung in 25 oder 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung [$0,05 \text{ \%}/0,02 \text{ \%}$ (w/v)] oder im 6-Well Format mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und anschließend für 4 min bei 1200 min^{-1} (279 g) pelletiert. Die RNA Isolation wurde anschließend nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in $40 \mu\text{l}$ (Total RNA Kit I) bzw. $15 \mu\text{l}$

(MicroElute[®] Total RNA Kit) RNase freiem ddH₂O eluiert. Die erhaltene RNA wurde vor der reversen Transkription (siehe 5.3.2.2) im Nanodrop[®] ND-1000-UV/Vis Spektralphotometer vermessen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.3.2.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Für die reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde pro Reaktionsansatz 500 ng aus eukaryotischen Zellen isolierte Gesamt-RNA (siehe 5.3.2.1) eingesetzt. Die Reaktion wurde in folgendem 20 µl Ansatz durchgeführt:

4 µl	First Strand Buffer (5x)
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)
1 µl	dN6 Primer (Random Hexamer Primer, 2 mg/ml)
x µl	Gesamt-RNA (500 ng)
ad 19 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Nach Abkühlen des Ansatzes auf RT wurde 1 µl SuperScript[®] II Reverse Transkriptase pro Reaktionsansatz zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 60 Minuten, gefolgt von einer zehnminütigen Denaturierung des Enzyms bei 70 °C. Durch Zugabe von je 1 µl RNase A Lösung und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die enthaltenen RNA-Moleküle verdaut. Die erhaltende cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.3.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die Expressionsstärke einer spezifischer mRNA zu quantifizieren, wurde im Anschluss an die Reverse Transkription (siehe 5.3.2.2) die Technik der quantitativen Real-Time PCR unter Verwendung des LightCycler[®] II Systems und des LightCycler[®] 480 Systems angewandt. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] Green I, welcher bei der Interkalation in doppelsträngige DNA (dsDNA) sein Fluoreszenzsignal um ein Vielfaches erhöht. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen ermöglicht. Man wählt einen Fluoreszenzwert bei dem sich die Fluoreszenzkurven im exponentiellen Bereich der Amplifikation befinden und ermittelt nach wie vielen Zyklen die Kurven jeweils diesen Wert erreichen. Dieser Wert entspricht dem C_T-Wert (cycle threshold) welcher mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz

korreliert und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden. Die Spezifität des PCR-Produktes kann nach abgelaufener PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse bestimmt werden, anhand derer die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann. Dabei wird die DNA durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I freigesetzt und eine Änderung der Fluoreszenz registriert. Jedes Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_M), die sowohl von seiner Produktlänge als auch vom GC-Gehalt abhängig ist. Die Spezifität des entstandenen Produktes wurde zusätzlich per Agarose-Gelelektrophorese auf 1,5 %igen Agarosegelen kontrolliert (siehe 5.3.3.3).

Die quantitative RT-PCR-Reaktion wurde in folgendem 20 µl Ansatz durchgeführt:

10 µl	SYBR [®] Premix Ex Taq [™] (LightCycler [®] II System) bzw.
10 µl	LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master (LightCycler [®] 480 System)
0,5 µl	Primer forward (20 µM)
0,5 µl	Primer reverse (20 µM)
1 µl	cDNA Template (25 ng/µl)
8 µl	ddH ₂ O

Im LightCycler[®] II System erfolgte die Reaktion unter folgenden Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung:	20 °C/s auf 95 °C	30 s	1 Zyklus
2. Denaturierung:	20 °C/s auf 95 °C	3 s	40 Zyklen
3. Primer-Annealing:	20 °C/s auf x °C	10 s	
4. Amplifikation:	20 °C/s auf 72 °C	8 s	
5. Messung:	20 °C/s auf x °C		

Analyse der Schmelztemperatur:

20 °C/s auf 95 °C	15 s	1 Zyklus
20 °C/s auf 65 °C	15 s	
20 °C/s auf 95 °C	15 s	
0,1 °C/s auf 40 °C		

Im LightCycler[®] 480 System erfolgte die Reaktion unter folgenden Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung:	4,4 °C/s auf 95 °C	10 min	1 Zyklus
2. Denaturierung:	4,4 °C/s auf 95 °C	10 s	45 Zyklen

3. Primer-Annealing:	2,2 °C/s auf x °C	10 s
4. Amplifikation:	4,4 °C/s auf 72 °C	20 s
5. Messung:	4,4 °C/s auf x °C	1 s

Analyse der Schmelztemperatur:

4,4 °C/s auf 95 °C	5 s	1 Zyklus
2,2 °C/s auf 65 °C	60 s	
0,11 °C/s auf 97 °C		
2,2 °C/s auf 40 °C	30 s	

Die optimale Annealing- und Messtemperatur wurde für das jeweilige Primerpaar experimentell ermittelt (siehe 5.1.6). Für die Analyse im LightCycler® 480 System wurde zusätzlich für jedes Primerpaar die Effizienz der Amplifikation pro Zyklus aus der Steigung einer Standardkurve bestimmt (siehe 5.1.6). Als Referenz zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expressionsstärke wurde die mRNA-Expression des Haushaltsgen β -Aktin benutzt. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler® II- und LightCycler® 480 Software (siehe 5.1.2) nach Angaben des Herstellers.

5.3.3 DNA-Methoden

5.3.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Genomischer DNA wurde aus Gewebe unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution der genomischen DNA erfolgte in 100 μ l AE-Puffer und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 μ l unter Verwendung folgenden Reaktionsansatzes:

x μ l	Genomische DNA (siehe 5.3.3.1)/ 20 ng Plasmid-DNA (siehe 5.3.1.4)
5 μ l	PCR-Puffer (10x)
0,5 μ l	dNTP Mix (jedes Nukleotid 10 mM)

0,5 µl	Primer forward (20 mM)
0,5 µl	Primer reverse (20 mM)
10 µl	Betain (5 M)
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Die Verwendung von 1 M Betain in einer PCR-Reaktion verbessert die Amplifikation von DNA indem es die Bildung von Sekundärstrukturen in GC-reichen Regionen reduziert (Henke *et al.*, 1997). Des Weiteren wird die Spezifität der PCR verbessert (Rees *et al.*, 1993).

Die Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 mit beheizbarem Deckel durchgeführt nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung:	94 °C	5 min	1 Zyklus
2. Denaturierung:	94 °C	1 min	40 Zyklen
3. Primer-Annealing:	x °C	1 min	
4. Amplifikation:	72 °C	2 min	
5. Finale Amplifikation:	72 °C	5 min	

Die optimale Annealingtemperatur für das jeweilige Primerpaar ist abhängig von der Nukleinsäuresequenz und wurde experimentell ermittelt (siehe 5.1.6). Abschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.3.3.3) überprüft. Das erhaltene PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung in der Herstellung von Reportergenkonstrukten (siehe 5.3.3.7) bei -20 °C gelagert.

5.3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA trägt eine negative elektrische Ladung, deshalb wandert sie im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Agarose bildet beim polymerisieren ein System von Poren durch die die DNA-Moleküle entlang des elektrischen Feldes wandern müssen, um die positive Elektrode zu erreichen. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es durch das Gel wandern, wodurch eine Auftrennung nach ihrer Größe bewirkt wird. Je nach Länge der zu analysierenden Fragmente wurden 1-2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 100 ml 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle durch kurzes Aufkochen gelöst und in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde die Probe, versetzt mit 10 % (v/v) Probenpuffer, in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung

erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt in 1x TAE-Puffer. Zur Visualisierung wurde das Gel anschließend zehn Minuten in einer 0,04 % (w/v) Ethidiumbromidlösung inkubiert und die DNA durch Anregung mit UV-Licht bei 245 nm detektiert. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoresziert durch die UV-Absorption im sichtbaren Bereich, wodurch die DNA als fluoreszierende Bande sichtbar wird. Die Größe der Fragmente konnte durch Verwendung verschiedener DNA-Größenstandards (siehe 5.1.4) bestimmt werden.

5.3.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung in Ethidiumbromidlösung (siehe 5.3.3.3) wurden die jeweiligen Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, abgewogen und nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte je nach Menge des PCR-Produkts in 30-50 µl ddH₂O und wurde bei -20 °C gelagert.

5.3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von gelöster DNA wurde photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des Gene Quant II RNA/DNA Calculators bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt dabei näherungsweise folgender linearer Zusammenhang: 1 OD_{260nm} Einheit = 50 µg/ml dsDNA

5.3.3.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Schneiden von DNA Strängen durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in folgendem 40 µl Reaktionsansatz:

0,5-1 µg	Plasmid-DNA
5 Units	der entsprechenden Enzyme
4 µl	des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers (10x)
4 µl	BSA (10x) falls vom Hersteller angegeben
ad 40 µl	ddH ₂ O

Die Ansätze wurden für ein bis zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur der jeweiligen Restriktionsendonuklease inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.3.3.3) aufgetrennt, auf erfolgreiches Schneiden kontrolliert und die benötigte Bande aus dem Gel für die weitere Ligation (siehe 5.3.3.7) extrahiert (siehe 5.3.3.4).

5.3.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide

Zur Herstellung von Reportergenkonstrukten wurde das jeweilige DNA-Fragment (Insert) mittels PCR (siehe 5.3.3.2) aus 0,5 µl genomischer DNA bzw. 20 ng Plasmid-DNA amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer enthielten zusätzlich die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen XhoI und EcoRV (siehe 5.1.6).

Das erhaltende PCR-Produkt wurde per Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.3.3.3) überprüft, das jeweilige DNA-Fragment ausgeschnitten und mit Hilfe der Gelextraktion aufgereinigt (siehe 5.3.3.4). Das PCR-Produkt wurden direkt in den pCR[®]II-TOPO[®] Vektor (siehe 5.1.5) nach Angaben des Herstellers per TOPO TA Cloning[®] Kit ligiert. Der komplette Ligationsansatz wurde in One Shot[®] Chemically-Competent *E. coli* TOP10F' transformiert (siehe 5.3.1.3). Nach der Mini-Präparation (siehe 5.3.1.4) wurde das Insert aus dem Topo Vektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten (siehe 5.3.3.6), elektrophoretisch aufgetrennt, und aufgereinigt. Der leere pGL4.10[*luc2*] Vektor wurde ebenso behandelt. Das Mengenverhältnis von geschnittenem Vektor und Insert wurde per Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C in folgendem 20 µl Ligationsansatz:

pGL4.10[<i>luc2</i>] Vektor	
fünffacher Überschuss an Insert	
2 µl	T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)
400 U	T4 DNA Ligase
ad 20 µl	ddH ₂ O

Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz in NEB 10-beta Competent *E. coli* DH10B transformiert (siehe 5.3.1.3). Nach der Plasmid Mini- und Midipräparation (siehe 5.3.1.4) wurde die Klonierung durch Sequenzierung bei der Firma Entelechon (Regensburg) überprüft.

5.3.3.8 Mutagenese von Plasmidkonstrukten

Nested Deletion

Zur Deletion der Promotorsequenz im humanen *p54^{nrb}*-Promotor-Reporterkonstrukt -8436 bis -6833 bp wurde die Methode der *nested deletion* angewendet. Diese Methode wurde erstmals von Henikoff 1984 beschrieben (Henikoff, 1984). Der DNA Strang wird dabei mit zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten, wovon die eine einen 3'-Überhang (Schutz) und die andere einen 5'-Überhang oder ein glattes Ende (Verdau) produzieren muss. Der geschnittene Vektor wird anschließend mit Exonuklease III verdaut, welche nur 3'-Enden von dsDNA abbaut aber nicht einzelsträngige 3'-Enden wie man sie bei einem 3'-Überhang (Schutz) vorfindet.

Nach bestimmten Zeitpunkten werden Aliquots aus der Hauptreaktion entnommen und die Reaktion gestoppt. Am angedauten Ende bleibt ein Einzelstrang zurück, der mit der einzelstrangspezifischen S1-Nuklease verdaut wird. Der zurückbleibende Doppelstrang mit glatten Enden wird ligiert und transformiert.

Für die Durchführung der *nested deletion* wurde das Erase-a-Base® System nach Angaben des Herstellers verwendet. Der humanen $p54^{nrb}$ pGL4.10[*luc2*] Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI (3'-Überhang: Schutz) und XhoI (5'-Überhang: Verdau) verdaut (siehe 5.3.3.6), die Linearisierung per Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.3.3.3) kontrolliert und der Vektor laut Protokoll gefällt. Die geschnittene DNA wurde anschließend mit Exonuklease III bei 25 °C und einer Verdaurrate von 90 bp/min verdaut. Jede Minute wurde eine Probe entnommen, mit S1-Nuklease verdaut und das Ausmaß der Deletion per Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (Abbildung 54). Die deletierten linearen Plasmide, von jedem Zeitpunkt, wurden ligiert und der komplette Ligationsansatz in *E. coli* DH10B transformiert (siehe 5.3.1.3). Um die Größe der Deletion genau zu charakterisieren wurden die entstandenen Klone sequenziert.

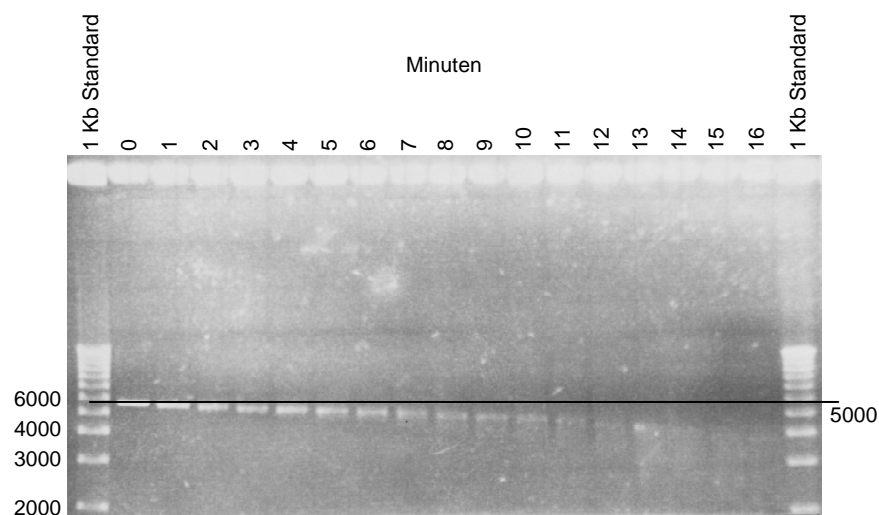


Abbildung 54: Deletierte Vektoren zu bestimmten Zeitpunkten des Exonuklease-Verdaus (1 % Agarose-Gel).

Ortsspezifische Mutagenese

Die gezielte Mutation von zwei möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen im humanen $p54^{nrb}$ -Promotor-Reporterkonstrukt -7079 bis -6833 bp wurde über *Ortsspezifische Mutagenese* (*site-directed mutagenesis*) mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dabei wird mit zwei zueinander komplementären, die gewünschte Mutation enthaltenden, Oligonukleotiden (siehe 5.1.6) ein Strang der zirkulären Plasmid-DNA von einer *PfuUltra* HF DNA Polymerase in mehreren Zyklen linear amplifiziert. Für die Amplifikation im Peltier Thermal Cycler PTC-200 wurde folgendes Programm verwendet:

1. Initiale Denaturierung:	95 °C	45 s	1 Zyklus
2. Denaturierung:	95 °C	45 s	16 Zyklen
3. Primer-Annealing:	1 °C/s auf 55 °C	45 s	
4. Elongation:	1 °C/s auf 68 °C	5 min	
5. Finale Elongation:	68 °C	4 min	

Eine PCR-Reaktion wurde mit 16 Amplifikationszyklen durchgeführt. Anschließend wird die parentale, methylierte Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease DpnI, welches nur methylierte DNA spaltet, abgebaut. Danach wird die amplifizierte, mutierte, einzelsträngige, zirkuläre DNA in *E. coli* XL1-Blue transformiert (siehe 5.3.1.3) und dort zur doppelsträngiger Plasmid-DNA vervollständigt. Die Mutation der Zielsequenz wurde so gewählt, dass eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle entsteht, durch welche das mutierte Plasmid selektioniert werden kann. Aus ausgewählten gewachsenen Kolonien wurden Kulturen angeimpft und die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation (siehe 5.3.1.4) isoliert und die mutierten Klone über ihr verändertes Restriktionsmuster (siehe 5.3.3.6) detektiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde per Sequenzierung bestätigt.

5.3.3.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation kann die direkte Interaktion von Proteinen (Transkriptionsfaktoren) mit bestimmten Teilen des Chromatins (DNA) lebendiger Zellen oder Geweben *in vivo* nachgewiesen werden.

Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde mit dem ChIP-IT[®] Express Enzymatic kit nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Es wurden zunächst HMB2, HMB2 -MIA5 und Mel Im Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % jeweils in einer 175 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit Formaldehyd fixiert, um das Chromatin mit den daran gebundenen Faktoren zu vernetzen. Nach Lyse der Zellen wurde das Chromatin per enzymatischen Verdau fragmentiert. Aus den jeweiligen Chromatinproben wurde durch Immunopräzipitation mit einem spezifischen YBX1-Antikörper (siehe 5.1.3) diejenigen DNA-Fragmente isoliert, an die YBX1 gebunden hat. Unter Zuhilfenahme des ChIP-IT[®] Control qPCR Kit-Human wurde die Immunopräzipitation zusätzlich mit einem RNA-Polymerase II-Antikörper (positiv Kontrolle) und mit einem unspezifischen IgG-Antikörper (negativ Kontrolle) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine mittels Protease-Behandlung verdaut und die aufgereinigten DNA-Fragmente mittels qRT-PCR mit dem LightCycler[®] II System analysiert (siehe 5.3.2.3). Für die PCR Analyse wurden jeweils 2 µl DNA-Templates pro Zelllinie eingesetzt: Input DNA (1:10), DNA isoliert per RNA-Polymerase II-ChIP (RNA Pol II), DNA isoliert per IgG-ChIP (IgG) und per YBX1-ChIP (YBX1). Es wurde

außerdem eine Kontrollreaktion ohne Template pro Zelllinie durchgeführt (H_2O). Für die PCR-Reaktion wurden zum einen, das im ChIP-IT[®] Control qPCR Kit-Human enthaltene Primerpaar gegen GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (positiv Kontrolle für RNA Pol II-ChIP) und zum anderen ein Primerpaar, welches die YBX1-Bindestelle im *hp54^{nrb}*-Promotor von -7180 bis -6990 bp relative zum Translationsstart umspannen verwendet (siehe 5.1.6). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden per Agarose-Gelelektrophorese auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert (siehe 5.3.3.3).

5.3.4 Protein-Methoden

5.3.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysat)

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen wurden diese mit 1x PBS gewaschen, im Falle der Kultivierung in 25 oder 75 cm² Zellkulturflaschen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung [0,05 %/0,02 % (w/v)] oder im 6-Well Format mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und anschließend für 5 min bei 3000 min⁻¹ (800 g) pelletiert. Je nach Zellmenge wurde das Pellet in 50-200 µl RIPA-Puffer (siehe 5.2.4) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das lösliche Gesamtproteine von den nichtlöslichen Zellbestandteilen sowie von DNA und RNA durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 min⁻¹ (15.700 g) bei 4 °C abgetrennt. Das Proteinextrakt wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Alle Schritte der Präparation werden auf Eis durchgeführt.

5.3.4.2 Herstellung von Kernproteinextrakten

Zur Isolation von Kernprotein aus Zellkulturen wurde die Methode nach Dignam (Dignam *et al.*, 1983) verwendet. Vor Beginn der Isolation wurde je 1 mM DTT zu Puffer I und II gegeben. Nach absaugen des Zellkulturmediums von einer zu mindestens 90 % konfluenten 75 cm² Zellkulturflasche, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 1 ml PBS abgeschabt und für 5 min bei 3000 min⁻¹ (800 g) und 4 °C pelletiert. Zur Lyse der Zellmembran wurde das Pellet in 400 µl Puffer I (siehe 5.2.4) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde zur Verbesserung der Lyse 25 µl 10 % (w/v) Nonylphenylpolyethylene Glykol NP-40, ein nichtionisches Tensid, zugegeben und der Ansatz mehrmals invertiert. Die Kernfraktion wurde bei für 1 min bei 10.000 min⁻¹ (9.300 g) und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand, mit dem enthaltenden Zytoplasma, verworfen. Das Kernpellet wurde in 50 µl Puffer II (siehe 5.2.4) resuspendiert und durch Schütteln für 15 min bei

4 °C lysiert. Um Kerndebris zu entfernen, wurde der Ansatz für 10 min bei 13.000 min^{-1} (15.700 g) und 4 °C zentrifugiert. Die Kernproteine befanden sich danach im Überstand, der Debris im Pellet. Die Kernproteinextrakte wurden aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen konnten diese nicht erneut eingefroren und wieder verwendet werden, da es dabei zu einer Degradation der Proteine kommt.

5.3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und Kernproteinen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Smith (Smith *et al.*, 1985) unter Verwendung des Pierce® BCA Protein Assay Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde in einer transparenten 96 Well Platte angesetzt. Diese beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) durch Proteine reduziert werden. Cu^+ bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, welcher durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Die Messung der Adsorption erfolgte im Mikroplatten Leser - Emax precision bei 562 nm. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Abgleich mit einer parallel mitgeführten BSA-Standardreihe bekannter Konzentration.

5.3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Hierbei wandern die Proteine zuerst in ein Sammelgel großer Porengröße bei neutralem pH, in welchem sie aufkonzentriert werden und anschließend in ein Trenngel mit basischem pH und kleiner Porengröße, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngelpuffer führt zu einem Stapelungseffekt an der Grenze zum Trenngel. Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel aus Polyacrylamid (PAA). Das negativ geladene Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet Proteine, versetzt ihnen eine konstante negative Ladung und führt zusammen mit der Denaturierung durch Aufkochen zu einer Zerstörung derer Tertiär- und Quartärstruktur, was zur Linearisierung der Proteine führt. Dies erlaubt eine Auftrennung der negativ geladenen Proteine nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, im elektrischen Feld in Richtung Pluspol, da die längeren Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden als kürzere Proteine.

Für die Durchführung der Elektrophorese wurde 50-75 µg Gesamtprotein (siehe 5.3.4.1) mit 1x Roti®-Load 1 (reduzierend) versetzt und für zehn Minuten bei 70 °C aufgeköcht. Das im Roti®-Load 1 enthaltende SDS führt, wie oben beschrieben, zu einem Auflösen von Sekundär- und

Tertiärstrukturen, durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und zur negativen Beladung der Proteine. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch Reduktion per β -Mercaptoethanol gespalten. Anschließend wurden die Proben auf ein PAA Gel (12,75 %-Trenn- und 4 %-Sammelgel; siehe 5.2.4) aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von $1,6 \text{ V/cm}^2$ Gelfläche in Laufpuffer per SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Abgleich des Molekulargewichtes wurde der Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™ mit aufgetragen (siehe 5.1.4).

5.3.4.5 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen aus Gesamtproteinextrakten wurden diese nach der Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht per SDS-PAGE (siehe 5.3.4.4) auf eine Sequi-Blot™ PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran geblottet und über die Detektion mit Antikörpern nachgewiesen. Hierzu wurde zunächst die PVDF-Membran fünf Minuten in Methanol aktiviert und anschließend für weitere fünf Minuten in Blotpuffer (siehe 5.2.4) äquilibriert. Währenddessen wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese für 15 Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels elektrophoretischen Transfers in einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell für 35 Minuten bei 15 V auf die Membran übertragen. Die PVDF Membran wurde, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, für eine Stunde in Blockierungslösung (siehe 5.2.4) abgestimmt auf den Primär-Antikörper (siehe 5.1.3) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem spezifischen Primär-Antikörper erfolgte in geeigneter Verdünnung (siehe 5.1.3) in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C . Nach Entfernen von ungebundenem Primär-Antikörper durch 3-maliges Waschen für fünf Minuten mit dem entsprechenden Puffer des Primär-Antikörpers wurde die Membran mit einem, gegen die Fc-Region des Primär-Antikörpers gerichteten, speziesspezifischen Sekundär-Antikörper in geeigneter Verdünnung (siehe 5.1.3) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden Alkalische Phosphatase konjugierte Sekundär-Antikörper verwendet. Nach 3-maligem Waschen für zehn Minuten mit dem entsprechenden Puffer des Primär-Antikörpers erfolgte die Detektion mit Hilfe des BCIP/NBT Kit nach Angaben des Herstellers. Durch Abspalten des Phosphatrestes vom 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) durch die Alkalische Phosphatase kommt es in Verbindung mit dem Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zur Bildung eines violetten bis blauen Farbstoffes. Durch diese Farbreaktion konnten spezifische Proteinbanden auf den PVDF Membranen visualisiert werden.

5.3.4.6 Immunhistochemie

Für den Nachweis von proliferierenden Zellen in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem murinem Knorpelgewebe wurde eine spezifische Färbung mit einem Antikörper gegen PCNA

(Proliferating Cell Nuclear Antigen) mit Hilfe des Animal Research Kits (ARK™, Peroxidase für Mouse Primary Antibodies) durchgeführt. Während der eukaryotischen DNA-Replikation umgibt PCNA die DNA als Ring, warum es auch als Ringklemmenprotein bezeichnet wird. Die replikative DNA-Polymerase bindet dabei an PCNA, bleibt während der gesamten Elongationsphase daran gebunden und verhindert deren Dissoziation vom DNA-Strang. Nur durch PCNA ist eine Vervielfältigung der gesamten DNA mit hoher Geschwindigkeit und ohne größere Unterbrechungen während der S-Phase des Zellzyklus möglich. PCNA ist dadurch ein spezifischer Marker für die DNA-Replikation und somit Proliferation.

Hierfür wurden die 2 µm Paraffinschnitte (siehe 5.3.8.6) durch eine 30-minütige Inkubation bei 72 °C im Wärmeschrank und nachfolgender Behandlung mit Xylol (2-mal 15 min) entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 10 min: 100 %, 95 %, 90 %, 70 %, 50 % Ethanol, ddH₂O). Nach einer fünfminütigen Inkubation mit PBS (pH 7,4), wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit *Peroxidase Block* für fünf Minuten blockiert. Die Schnitte wurden in PBS (pH 7,4) gewaschen (3-mal 5 min), danach für vier Minuten bei 600 Watt und anschließend für fünf Minuten bei 350 Watt in einem Citrat-Puffer (pH 6, siehe 5.2.4) in einer Mikrowelle erhitzt. Durch die Hitzebehandlung mit Citrat-Puffer erfolgt eine Antigendemaskierung der Proteine. Dabei werden Epitope freigelegt, die durch die Formalinfixierung verursachte Proteinvernetzung verändert wurden und somit vom Antikörper jetzt wiedererkannt werden können. Nach dem Abkühlen der Schnitte im Citrat-Puffer für 20 Minuten wurden die Schnitte in PBS (pH 7,4) gewaschen (3x 5 min) und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert (siehe 5.1.3). Der primäre Antikörper wurde vor Gebrauch in der folgenden Reaktion biotinyliert:

Pro Schnitt (50 µl):

47,01 µl	<i>Antibody Diluent</i>
0,79 µl	<i>Biotinylation Reagent</i>
0,2 µl	PCNA-Antibody

15 min bei Raumtemperatur inkubieren

6 µl	<i>Blocking Reagent</i>
------	-------------------------

15 min bei Raumtemperatur inkubieren

Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS (pH 7,4) à fünf Minuten folgte die Inkubation mit HRP-gekoppeltem Streptavidin (*Streptavidin-HRP*) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit PBS (pH 7,4; 3x 5 min) erfolgte die Detektion der Antikörperbindung mittels *DAB+ Substrat-Chromogen* nach Anleitung des Herstellers. Die Zellkerne wurden nach Waschen in PBS (pH 7,4; 3x 5 min) mittels Hämalaun-Färbung visualisiert. Die Schnitte wurden in Kaisers

Glyceringelatine mit Deckgläsern eingedeckelt und mit Hilfe eines Zeiss Mikroskops (Axiovert 200, HAL100, AxioCam MRc) ausgewertet und der AxioVision Software (Release 4.5) fotografiert.

5.3.5 Zellkulturmethoden

5.3.5.1 Kultivierung von humanen und murinen Melanomzelllinien

Die verwendeten Melanomzelllinien (siehe 5.1.8) wurden in Kultivierungsmedium (siehe 5.2.2) bei 37 °C und 8 % CO₂ kultiviert. Für die Passagierung wurden die adhärenenten Zellen, nach dem Waschen mit PBS, durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung [0,05 %/0,02 % (w/v)] zunächst von der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend in Kultivierungsmedium aufgenommen und für 4 min bei 1200 min⁻¹ (279 g) zentrifugiert, um das Trypsin von den Zellen zu entfernen. Das Zellpellet wurde in Kultivierungsmedium resuspendiert und 1:5 bis 1:10 mit Kultivierungsmedium verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Das Zellkulturmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt.

Zur Kultivierung von HMB2 -MIA5 und -MIA8 Zellklonen, welche stabil mit einem *antisense* MIA Konstrukt transfiziert worden waren, und von HMB2 *lacZ* Kontrollklonen wurde dem Medium 2 mg/ml Geneticin^R zugesetzt. Durch diesen Selektionsdruck wurde die Ausverdünnung des Plasmids verhindert.

5.3.5.2 Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen aus Mäusen

Die Isolation mesenchymaler Stammzellen erfolgte aus Knochenmark von Femur und Tibia von Mäusen. Für eine Charge wurden 6 bis 8 Mäuse in einem Alter von 6 bis 8 Wochen zusammengefasst. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet und die folgenden Schritte unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Beine jeder Maus wurden an der Huft komplett vom Rumpf abgetrennt, die Haut abgezogen und die Muskulatur bis auf die Knochen mit einer Schere entfernt. Zwischen der Condylus medialis und Condylus lateralis des unteren Endes des Oberschenkelknochens bzw. des Tibia Kopfes (Caput tibiae) wurde mit einer Kanüle vorsichtig ein Loch bis zur Knochenmarkhöhle gebohrt. Auf den jeweils gegenüberliegenden Seiten wurden die Knochen auf Höhe der Metaphyse abgeschnitten um die Knochenmarkhöhle zu eröffnen. Die Knochen wurden einzeln mit der Schnittfläche nach unten in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und das Knochenmark durch Zentrifugation für 2 min bei 2600 min⁻¹ (600 g) gewonnen. Das Knochenmark aus den einzelnen Knochen wurde in Kultivierungsmedium (siehe 5.2.2) resuspendiert, vereint und für 5 min bei 1200 min⁻¹ (279 g) zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Kultivierungsmedium resuspendiert und das

Knochenmark aus 3 bis 4 Mäusen auf eine 75 cm² Zellkulturflasche verteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Isolation erfolgt im Wesentlichen durch einen Adhärenzschritt. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel, um die nicht adhärent gewordenen Zellen, vor allem die Erythrozyten und Leukozyten, zu entfernen. Danach werden die Zellen alle drei bis vier Tage mit frischem Medium versorgt. Diese Zellen wurden als Passage Null betrachtet.

Für die weitere Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die konfluenten Stammzellen wie unter 5.3.5.1 beschrieben von der Zellkulturflasche mit der Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C abgelöst, zentrifugiert, das Zellpellet in Kultivierungsmedium resuspendiert und 1:5 bis 1:10 mit Kultivierungsmedium verdünnt in neue 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt. Das Zellkulturmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Die primären mesenchymalen Stammzellen wurden bevorzugt in den Passagen 3 bis 6 verwendet.

5.3.5.3 Differenzierung von murinen mesenchymalen Stammzellen

Die Differenzierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC) erfolgte in zweidimensionalen Kulturen, wobei 5 x 10⁵ mMSC pro 75 cm² Zellkulturflasche in Kultivierungsmedium (siehe 5.2.2) ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Differenzierungsmedium (siehe 5.2.2) ersetzt dem 10 ng/ml TGF-β3 zur Induktion der chondrozytären Differenzierung zugesetzt wurde. Die Zellen wurden bei 100 % Konfluenz bzw. am nächsten Tag geerntet um RNA (siehe 5.3.2.1) für qRT-PCR, Gesamtproteinextrakt (siehe 5.3.4.1) für Western Blot oder Kernproteinextrakte (siehe 5.3.4.2) für EMSA zu isolieren. Es wurden jeweils mindestens 3 Chargen Wildtyp- und MIA-defiziente-mMSC eingesetzt.

5.3.5.4 Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Für die mittel- bis langfristige Konservierung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Um zu verhindern, dass die Zellen durch die beim Einfrieren entstehenden Kristalle zerstört werden, wurden sie in speziellem Einfriermedium (siehe 5.2.2) eingefroren. Zum Einfrieren von humanen Melanomzelllinien sowie primären murinen mesenchymalen Stammzellen wurden diese durch eine Trypsin/EDTA-Lösung [0,05 %/0,02 % (w/v)] aus einer konfluenten 75 cm² Zellkulturflasche abgelöst, durch Zentrifugation für 4 min bei 1200 min⁻¹ (279 g) pelletiert und in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums (siehe 5.2.2) resuspendiert. Je 900 µl der Zellsuspension wurden in ein Cryoröhrchen auf Eis überführt, in welches 900 µl 4 °C kaltes Einfriermedium vorgelegt wurde. Die Zellsuspension wurde kurz invertiert und die Cryoröhrchen in ein auf 4 °C vorgekühltes und mit Isopropanol befülltes Qualifreeze Cryo-

Einfriergerät überführt. Darin wurden sie mit einer Abkühlrate von 1 °C/min bei -80 °C eingefroren, bevor die Cryo-Kulturen in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen im Cryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut in Kulturmedium überführt und 4 min bei 1200 min⁻¹ (279 g) zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

5.3.5.5 Transiente Transfektion mit siRNA

Zur Transfektion von Mel Im Zellen mit siRNAs gegen humanes MIA (siehe 5.1.6) wurde das HiPerFect[®] Transfektionsreagenz verwendet. Dazu wurden je 0,75 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well Platte in 2,3 ml Kultivierungsmedium ohne FKS (siehe 5.2.2) ausgesät. Pro Well wurden 5,4 µl der entsprechenden siRNA (108 pmol) mit 94,6 µl Kultivierungsmedium ohne FKS und 18 µl HiPerFect Reagenz vermischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz langsam unter Schwenken auf die frisch ausgesäten, noch nicht adhären Zellen pipettiert. Nach vierstündiger Inkubationszeit bei 37 °C und 8 % CO₂ wurde dem Medium 10 % FKS zugegeben. Das Kultivierungsmedium wurde an Tag 2 nach der Transfektion erneuert. Die Zellen wurden an Tag 3 nach der Transfektion für Luciferase-Reporter-Gen-Assays (siehe 5.3.5.7) eingesetzt oder an Tag 4 für die Isolation von Kernproteinextrakten (siehe 5.3.4.2) für EMSA-Analysen bzw. zur Isolation von RNA (siehe 5.3.2.1) für qRT-PCR geerntet.

Für die Transfektion von HMB2 und Mel Im Zellen mit siRNA gegen humanes YBX1 wurde die Lipofectamine[®] RNAiMAX Methode nach Angaben des Herstellers angewandt. Hierzu wurden 1 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät, am nächsten Tag mit 60 pmol siRNA transfiziert und den darauf folgenden Tag für Luciferase-Reporter-Gen-Assays (siehe 5.3.5.7) eingesetzt. An Tag 2 nach Transfektion wurden die Zellen zur Isolation von RNA (siehe 5.3.2.1) für die qRT-PCR geerntet.

Murine mesenchymale Stammzellen wurden mit der Lipofectamine[®] 2000 Methode nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Es wurden 1 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und am nächsten Tag mit 100 pmol siRNA gegen murines MIA bzw. p54^{nrB} transfiziert. Die Zellen wurden an Tag 1 nach Transfektion für Luciferase-Reporter-Gen-Assays (siehe 5.3.5.7) eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen an Tag 2 nach Transfektion für die Isolation von RNA (siehe 5.3.2.1) für qRT-PCR bzw. Gesamtproteinextrakt (siehe 5.3.4.1) für Western Blot geerntet, oder für Proliferations-Assays (XTT) ausgesät (siehe 5.3.5.8).

5.3.5.6 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA (Nukleofektion™)

Für die Überexpression von humanem MIA/CD-RAP bzw. p54^{nrb} in murinen mesenchymalen Stammzellen wurde die von der Firma Lonza entwickelte Nucleofector™ Technologie, welche auf dem Prinzip der Elektroporation beruht, verwendet. Durch die vorübergehende Erzeugung von kleinen Poren in Zellmembranen können Nukleinsäuren nicht nur in das Zytoplasma sondern auch direkt in den Zellkern eukaryotischer Zellen eingebracht werden. Die Transfektionseffizienz ist somit unabhängig von der Zellproliferation, da Nukleinsäuren normal nur während der Auflösung der Kernmembran bei der Zellteilung in den Zellkern eindringen können.

Für diese Methode wurde das Human MSC Nucleofector® Kit zusammen mit dem Nucleofector™ I Device nach den Angaben des Herstellers verwendet. Pro Nukleofektionsansatz wurden 1×10^6 Zellen mit je 2 µg des entsprechenden Expressionskonstrukts (siehe 5.1.5) transfiziert. Die Nukleofektion wurde unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Programmes (C-17) für hohes Zellüberleben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen im 6-Well Format für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert und anschließend für Proliferations- (XTT) (siehe 5.3.5.8) und Luciferase-Reporter-Gen-Assay (siehe 5.3.5.7) verwendet bzw. für die Isolation von RNA (siehe 5.3.2.1) für qRT-PCR geerntet.

5.3.5.7 Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen (Promotoren) lassen sich mit Hilfe von Reporter-Gen-Analysen untersuchen. Um die Aktivität eines Promotors zu analysieren, wird ein DNA-Fragment, welches den Promotorbereich enthält, vor das *Luciferase*-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* eines Reportervektors kloniert (siehe 5.3.3.7). Die Expression des Leuchtkäfer-*Luciferase*-Reportergens verhält sich im eukaryotischen Modellsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe des Substrats Luciferin kommt es durch das exprimierte Luciferase-Enzym in Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wird. Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz in den einzelnen Versuchsansätze berücksichtigen zu können, wurden die Zellen mit dem Kontrollvektor pRL-TK (siehe 5.1.5), der das *Luciferase*-Gen der Seefeder *Renilla reniformis* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla-Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer quantifiziert und für die Normalisierung der Werte in Abhängigkeit von der Transfektionseffizienz genutzt.

Zur Durchführung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendet. Die Zellen wurden dabei nach der Lipofectamine® Methode mit Lipofectamine® Reagent und Plus™ Reagent nach Angaben des Herstellers transfiziert. Einen

Tag vor der Transfektion wurden folgende Zellzahlen pro Well einer 6-Well Platte im jeweiligen Kultivierungsmedium (siehe 5.2.2) ausgesät: 1 - 2×10^5 mMSC; $1,5 \times 10^5$ HMB2 *lacZ*-, -MIA5, und -MIA8 Zellklone; 2×10^5 Mel Im, Mel Ju, Mel Juso, Mel Ei Zellen. Am folgenden Tag wurde das Kultivierungsmedium der Melanomzelllinien erneuert bzw. das Kultivierungsmedium der mMSC durch Differenzierungsmedium (siehe 5.2.2), versetzt mit 10 ng/ml TGF- β 3 zur Induktion der chondrozytären Differenzierung, ersetzt. Es wurden 0,5 μ g Plasmid-DNA (das jeweilige Promotor-Reporterkonstrukt siehe 5.1.5 bzw. der dazugehörige Leervektor als Kontrolle) und 0,1 μ g pRL-TK Vektor pro Well nach Angaben des Herstellers transfiziert. Das Medium wurde 24 bis 36 Stunden nach Transfektion abgekippt und die Zellen mit normalem Leitungswasser zweimal gespült. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit 300 μ l Lysispuffer pro Well lysiert und die Luciferaseaktivität aus je 50 μ l des Lysats am Röhrchen Luminometer - Lumat LB9501/ 9507 unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay System quantifiziert. Die basale Aktivität des pGL2-, pGL3basic oder des pGL4.10[*luc2*] Vektors wurde gleich eins gesetzt. Alle Transfektionen wurden mindestens zweimal wiederholt.

5.3.5.8 Proliferations-Assay (XTT)

Für die Bestimmung der Proliferation und Wachstumsfähigkeit von murinen mesenchymalen Stammzellen wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Assay beruht auf der Spaltung des gelblichen Tetrazoliumsalzes XTT durch die mitochondriale Dehydrogenase, wodurch ein oranger Formazan Farbstoff entsteht. Diese Reaktion findet nur in metabolisch aktiven und wachstumsfähigen Zellen statt. Der Formazan Farbstoff ist wasserlöslich, somit kann dessen Entstehung photometrisch im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 bis 500 nm quantifiziert werden. Ein Anstieg an lebenden Zellen führt zu einem Anstieg der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenase, was mit der Menge an sich bildenden orangen Formazan korreliert. Hierfür wurden 1000 und 2000 unbehandelte, mit siRNA (siehe 5.3.5.5) oder Plasmid-DNA (siehe 5.3.5.6) transfizierte mMSC in einer 96-Well Platte als Dreifach-Ansätze in Kultivierungsmedium ohne Phenolrot (siehe 5.2.2) ausgesät. Zur Induktion der chondrozytären Differenzierung wurde dem Medium 10 ng/ml TGF- β 3 zugesetzt. Die Zellen wurden für 8 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 4 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wurden je 50 μ l XTT *Labeling Mixture* pro Well zugesetzt und die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der dabei entstehende Farbumschlag wurde jeweils nach 2 und 4 Stunden im Mikroplatten Leser - Emax precision bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm vermessen und die relative Proliferationsrate [%] bestimmt.

5.3.5.9 BrdU/Hoechst Quenching-Technik

Die Dynamische Proliferationsanalyse mittels kontinuierlicher BrdU-Zellmarkierung ermöglicht die Beobachtung der Zellproliferation und der Zellzyklusverteilung innerhalb drei aufeinander folgenden Zellzyklen. Dabei kann die Zellzyklusphasenverteilung von Zellen, die aktiv zur Zellvermehrung beitragen (G1-, S-, G2/M-Phase), sowie der Prozentsatz an Zellen, die in der Ruhephase sind (G0-Phase Zellen) bestimmt werden. Bei der BrdU/Hoechst-Quenching-Technik werden die Zellen kontinuierlich mit dem Nukleotidanalogen BrdU inkubiert, welches in mehreren aufeinander folgenden S-Phasen anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Die dynamische Analyse beruht dabei auf den gleichzeitigen Einsatz von zwei DNA-Farbstoffen: Hoechst 33258 und Propidiumiodid (PI) (siehe 5.1.3). Hoechst 33258 bindet dabei an AT-Basenpaare und zeigt eine Reduktion seiner Fluoreszenzintensität durch in die DNA eingebautes BrdU (Quenching). Die Fluoreszenzintensität von PI, einem DNA-interkalierenden Farbstoff, wird nicht durch eingebautes BrdU beeinflusst. Die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen kann durch die zweidimensionale Auftragung der Fluoreszenzintensität von Hoechst 33258 gegen PI analysiert werden (Brockhoff, 2007). Die Zugabe und die Inkubation von Zellen mit BrdU wurde unter abgedunkelten Bedingungen durchgeführt. Dies sollte die Zellen, die aufgrund des Einbaus von BrdU in die DNA sensitiv gegenüber kurzwelligem Licht sind, vor lichtinduzierten DNA-Schäden schützen.

Für die Messung wurden 5×10^5 murine mesenchymal Stammzellen an Tag 1 in 25 cm² Zellkulturflaschen in Kulturmedium ausgesät. An Tag 4 und Tag 6 erfolge jeweils ein Mediumwechsel, wobei man 120 µM 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) und 60 µM 2'-Deoxycytidin (DC) zusetzte. Die Zugabe von DC diente dazu, eventuelle BrdU-induzierte Störungen des Nukleotidstoffwechsels zu vermeiden (Kaufman und Davidson, 1978; Davidson und Kaufman, 1979). Die Zellen wurden zeitgleich an Tag 8 durch Trypsinierung geerntet (siehe 5.3.5.2), 4 min bei 1200 min⁻¹ (279 g) und 4 °C pelletiert und zweimal mit eiskaltem DNA-Waschpuffer (siehe 5.2.4) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 5×10^5 Zellen in 0,5 ml DNA-Färbepuffer (enthält 1.2 µg/ml Hoechst 33258) resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Poot *et al.*, 1994; Kubbies, 1999). Zur Bestimmung des DNA Gehaltes wurde 1.5 µg/ml Propidiumiodid (PI) pro Ansatz zugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde am Durchflusszytometer - LSR-II bei einer Durchflussrate von 300 Ereignissen pro Sekunde unter Anleitung von Elisabeth Schmidt-Brücken (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) gemessen.

5.3.6 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

5.3.6.1 Herstellung radioaktiv markierter EMSA-Sonden

Die radioaktive Markierung von dsDNA-Oligonukleotiden erfolgte durch eine blunt-end Reaktion. Um dsDNA-Fragmente zu generieren, wurden je 10 µl forward und reverse Oligonukleotide (20 µM) mit 80 µl ddH₂O gemischt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Beim langsamen Abkühlen des Heizblocks auf Raumtemperatur kam es zur Zusammenlagerung der Oligonukleotide zu einem Doppelstrang. Die so entstandene blunt-end dsDNA, wurde zusammen mit den bereits annealten AP1- und CREB-Konsensus-Oligonukleotiden der Firma Promega (1,75 pmol/µl) im folgenden Reaktionsansatz radioaktiv markiert.

2 µl	dsOligonukleotid
2 µl	Polynukleotidkinase Puffer (10x)
12 µl	ddH ₂ O
1 µl	Polynukleotidkinase
3 µl	[γ- ³² P]-dATP (10 mCi/ml)

Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei der Transfer der ³²P markierten Phosphate von der Gammaposition des ATP zum 5' Hydroxyende der dsDNA-Oligonukleotide katalysiert wurde.

5.3.6.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Zur Trennung radioaktiv markierter DNA-Fragmente von freien, nicht aufgebrauchten [γ-³²P]-dATP Nukleotiden wurden illustra™ Nick™ Columns verwendet. Dabei ließ man die Pufferflüssigkeit aus den Säulen abtropfen und brachte den Reaktionsansatz der ³²P Markierungsreaktion auf die Säule auf. Die Säule wurde 2-mal mit 200 µl TE-Puffer (pH 7,5) gespült, wobei die ersten beiden Fraktion, die man erhielt aufgefangen und verworfen wurden, da sie hauptsächlich aus Puffer mit nur sehr geringen Anteilen an radioaktiv markierter EMSA-Sonden bestand. Durch weiteres 2-maliges Spülen der Säule mit je 200 µl TE-Puffer konnten noch zwei weitere Fraktionen gewonnen werden, wobei sich die benötigte markierte dsDNA-Sonde in diesen Fraktionen befanden. Freie [γ-³²P]-dATP Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Für die Electrophoretic Mobility Shift Assays wurde jeweils diejenige Fraktion genutzt, welche die höchste Effizienz der radioaktiven Markierung aufwies.

5.3.6.3 EMSA (Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay)

Um DNA-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu analysieren, wurden Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays (EMSAs) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einem veränderten Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit gebundenen Proteinen im Gegensatz zu freien Fragmenten in nativer Gelelektrophorese. Der unspezifische Kompetitor Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC) wurde hinzugefügt um eine unspezifische Bindung der Proteinextrakte an DNA zu verhindern und um somit den Hintergrund zu reduzieren. Der Nachweis der DNA erfolgte über deren radioaktive Markierung, durch eine blunt-end Reaktion (siehe 5.3.6.1). Ein Reaktionsansatz für den EMSA setzte sich wie folgt zusammen:

6-7 µg	Kernprotein
4 µl	5x EMSA Binding Puffer
1 µl	Poly(dI-dC) (2,5 mg/ml)
2-3 µl	radioaktiv markiertes Oligonukleotid
ad 20 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde zunächst für zehn Minuten ohne radioaktiv markiertes Oligonukleotid bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der markierten Sonde folgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur damit die, im Kernextrakt enthaltenen, nachzuweisenden Proteinen an das DNA-Fragment binden können. Für den Nachweis der spezifischen Bindung von Proteinen an DNA wurde in Kontrollansätzen zusätzlich unmarkiertes Oligonukleotid in 60-400-fachem Überschuss als Kompetitor zum Reaktionsansatz zugegeben. Die Ansätze wurden vor dem Auftragen auf ein natives 4,5 % Polyacrylamidgel mit 4 µl Ladepuffer (siehe 5.2.4) versetzt. Das Gel lief bei einer konstanten Spannung von 0,7 V/cm² Gelfläche in 0,25x TBE für ca. 2,5 Stunden. Nach dem Trocknen auf Whatman 3MM Filterpapier in einem Gel Trockner - SLAB Gel Dryer, wurde das Gel autoradiographisch analysiert. Hierfür wurde ein Hyperfilm™ HP Röntgenfilms für etwa 24 Stunden aufgelegt und anschließend entwickelt.

5.3.6.4 Nachweis radioaktiver Produkte durch Autoradiographie

Radioaktiv markierte Oligonukleotide in Gelen lassen sich durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektieren. Durch die Strahlungsenergie der Radioisotope werden die in die Festphase des Röntgenfilmes eingebetteten Silberhalogenidkristalle zu metallischem Silber reduziert. Daraus ergibt sich ein latentes Bild aus Silberpartikeln. Durch die Entwicklung des Filmes wird dieses Bild verstärkt, wobei nach anschließender Fixierung überschüssiges Silberhalogenid entfernt wird. Da die Filmschwärzung innerhalb eines bestimmten Strahlungsbereiches direkt proportional zur Menge an radioaktiver Strahlung ist, können Autoradiogramme quantitativ

ausgewertet werden. Die Expositionszeit des auf das Gel aufgelegten Röntgenfilms richtet sich nach der Qualität und Quantität der radioaktiven Strahlungsquelle.

5.3.7 *In situ* Hybridisierung

Für die Durchführung aller Reaktionen bzw. für das Ansetzen von Lösungen wurden sterile, RNase freie Spitzen, Reaktionsgefäße, Cellstar® Tubes sowie Nuklease-freies H₂O verwendet. Etwaige RNase-Kontaminationen auf Oberflächen und Geräten wurden mit RNase AWAY™ entfernt. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden in sterilen Glasküvetten (4 Stunden bei 200 °C) durchgeführt.

5.3.7.1 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Zur Detektion der mRNA verschiedener Gene auf murinen Paraffinschnitten wurden Digoxigenin-markierte murine *sense*- und *antisense*-RNA-Sonden hergestellt. Diese wurden mittels *in vitro* Transkription aus den hier aufgeführten vorher linearisierten Plasmiden gewonnen:

Plasmid	Gen	Sonden-bereich	Sonde	Länge [bp]	Enzym für Linearisierung	RNA-Polymerase
pm2a1-1	<i>Col2a1</i>	3' Bereich	sense	387	HindIII	T7
		3' Bereich	antisense	387	EcoRI	T3
pmCol10a1	<i>Col10a1</i>	3' Bereich	sense	425	XbaI	Sp6
		3' Bereich	antisense	425	BamHI	T7
mSox9	<i>Sox9</i>	Exon 3	sense	254	EcoRI	T3
		Exon 3	antisense	254	HindIII	T7

Nach Linearisierung der Plasmide durch Schneiden (siehe 5.3.3.6) mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen wurden die geschnittenen Plasmide nach Auftragung auf einem 1 %igen Agarosegel (siehe 5.3.3.3) per QIAquick® Gel Extraction Kit aufgereinigt (siehe 5.3.3.4), um proteinogene Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die *in vitro* Transkription wie folgt für zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt:

1 µg	linearisierte DNA (aufgereinigt)
4 µl	5x Transkriptionspuffer,
2 µl	RNA-Polymerase,
1 µl	RiboLock™
2 µl	DIG RNA Labeling Mix
ad 20 µl	ddH ₂ O

Anschließend wurden 1 µl tRNA (1 mg/ml), 7 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 75 µl 100 % EtOH zugegeben. Nach der Fällung bei -80 °C für drei Stunden, erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 min⁻¹ (15.700 g) und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und für weitere 5 min bei 13.000 min⁻¹ und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgenommen, das Pellet bei 37 °C für zwei Minuten getrocknet, anschließend in 100 µl RNase freiem H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Sondenintegrität wurde mittels Dot-Blot überprüft. Dazu wurde auf eine PVDF Membran je 1 µl der gelabelten Sonde pipettiert und in einer Glas-Petrischale bei 120 °C für 30 Minuten gebacken. Nach 2-maligem waschen für fünf Minuten mit PBST [0,1 % (v/v) Tween] wurde die Membran mit 3 % BSA in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Membran wurde 2-mal für fünf Minuten mit PBST gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments 1:3000 in PBST inkubiert. Nach zwei Waschgängen mit PBST für jeweils fünf Minuten erfolgte die Entwicklung bei Raumtemperatur im Dunkeln mit unverdünntem BM Purple AP Substrat.

5.3.7.2 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden und Detektion

Vor der Hybridisierung wurden die 2 µm Paraffinschnitte (siehe 5.3.8.6), nach 30-minütiger Inkubation bei 72 °C im Wärmeschrank, in sterilen Glasküvetten bei Raumtemperatur wie folgt vorbehandelt (Volumen, soweit nicht anders angegeben, jeweils ca. 200 µl):

Lösung	Dauer
Xylol	2x 10 min
100% EtOH	2x 5 min
EtOH-Reihe (95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %)	jeweils 2 min
PBS	2x 5 min
4 % (w/v) PFA in PBS	30 min
10 µg/ml Proteinase K in Proteinase K Puffer (150 µl)	10 min
PBS	5 min
2x SSC	2x 5 min
Tris/Glycin Puffer	15 min

Anschließend wurden die Schnitte für drei Stunden bei 55 °C in BD Atlas™ Glass Hybridization Chambers in 1,8 ml Hybridisierungspuffer (siehe 5.2.4) vorhybridisiert. Jeweils 5 µl der Col2a1- und Col10a1- bzw. 15 µl der Sox9-RNA-Sonde wurde mit 150 µl Hybridisierungspuffer versetzt, für fünf Minuten bei 80 °C denaturiert und anschließend den Hybridisierungskammern zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 55 °C über Nacht. Am nächsten Tag folgten mehrere Waschschrte (siehe 5.2.4):

Lösung	Dauer, Temperatur
2x SSC	2x 20 min, RT
2x SSC	20 min, 50 °C
1x SSC	20 min, 55 °C
1x SSC	20 min, 60 °C
1x SSC	10 min, RT
NTE	15 min, 37 °C
10 µg/ml RNase A in NTE (150ml)	30 min, 37 °C
NTE	15 min, 37 °C
2x SSC	spülen, RT
2x SSC	60 min, 50 °C
1x SSC	spülen, 55 °C
1x SSC	60 min, 55 °C
1x SSC	60 min, 60 °C
1x SSC	30 min, RT

Die Schnitte wurden anschließend in einer feuchten Kammer mit 10 % (w/v) Blocking Reagent in MABT für 60 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet.

Zum Nachweis der Digoxigenin-markierten Sonden wurden Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente auf die Schnitte gegeben. Dazu wurden an den Ecken eines Deckglases Abstandshalter, in Form von kleinen Knetgummikugeln, gesetzt und dieses dann kopfüber auf den Schnitt aufgelegt. In den so entstandenen Zwischenraum wurden etwa 500 µl Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente 1:5000 in 1 % (w/v) Blocking Reagent in MABT pipettiert. Die Antikörperreaktion erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser entfernt und die Schnitte bei Raumtemperatur gewaschen (siehe 5.2.4):

Lösung	Dauer
TBST	4x 10 min
TBST	1x 20 min
NTM	3x 10 min

Anschließend wurden die Schnitte wieder mit Deckgläsern mit Knetgummikugeln versehen und mit Färbelösung (siehe 5.2.4) gefärbt. Die Schnitte wurden bis zu sieben Tage im Dunkeln inkubiert, wobei die Färbelösung alle zwei Tage erneuert wurde. Nach erfolgreicher Färbereaktion bzw. nach spätestens sieben Tagen wurden die Deckgläser entfernt und die Schnitte 3x je 10 Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine mit Deckgläsern eingedeckelt und mit Hilfe eines Zeiss Mikroskops (Axiovert 200, HAL100, AxioCam MRc) und der AxioVision Software (Release 4.5) fotografiert und die Länge der gefärbten Bereiche gemessen.

5.3.8 Arbeiten mit Mäusen

5.3.8.1 Haltungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden unter festgeschriebenen pathogenfreien Bedingungen bei 22 °C, 70 % relativer Luftfeuchtigkeit und eines 12 Stunden anhaltenden Hell-Dunkel-Zyklus im SPF- (spezifisch pathogenfreien) Tierstall der Universität Regensburg gehalten. Die Versorgung mit Wasser und Standard-Pelletfutter (Ssniff® R/M-H Cat. V1534-0, Firma Ssniff, Soest) erfolgte *ad libidum*. Die Mäuse wurden in Polypropylen Käfigen, ausgebettet mit Sägemehl, gezüchtet. Die Käfige wurden 2-mal pro Woche gereinigt und desinfiziert.

5.3.8.2 Zuchtbedingungen

Die bestehenden Mauslinien wurden nach den Empfehlungen des Tierärztlichen Dienstes der Universität Regensburg gezüchtet. Das Mindestalter bei Zuchtbeginn betrug 55 Tage.

5.3.8.3 Generierung der heterozygoten MIA-*knockout*-Mauslinie

Um eine heterozygote MIA-*knockout*-Mauslinie zu generieren wurden homozygote MIA-*knockout*-Mäuse mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt. Der Erfolg der Kreuzung wurde per Genotypisierung (siehe 5.3.8.4) bestimmt.

5.3.8.4 Genotypisierung auf MIA-Defizienz

Die Bestimmung des Genotyps im Hinblick auf das *Mia*-Gen, wurde mittels PCR bestimmt. Zunächst wurde aus einer 3 mm großen Schwanzspitzen-Biopsie von adulten Mäusen sowie

Embryonen die genomische DNA isoliert (siehe 5.3.3.1) und in 100 µl AE-Puffer eluiert. Anschließend wurde unter Verwendung von Mia-spezifischen Primern (siehe 5.1.6) 10 µl genomische DNA in eine 50 µl PCR-Reaktion ohne die Verwendung von Betain eingesetzt (siehe 5.3.3.2). Die Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung:	94 °C	5 min	1 Zyklus
2. Denaturierung:	94 °C	30 s	35 Zyklen
3. Primer-Annealing:	58 °C	30 s	
4. Amplifikation:	72 °C	30 s	
5. Finale Amplifikation:	72 °C	5 min	

Zur Auswertung wurden anschließend 10 µl der Genotypisierungs-PCR per Agarose-Gelelektrophorese (siehe 5.3.3.3) aufgetrennt und die spezifischen Bandenmuster zur Bestimmung des Genotyps abgeglichen. Ein Beispiel für die Auswertung einer Genotypisierung auf MIA-Defizienz ist in Abbildung 55 gezeigt. Für jede Genotypisierung wurde die PCR standardmäßig einmal wiederholt.

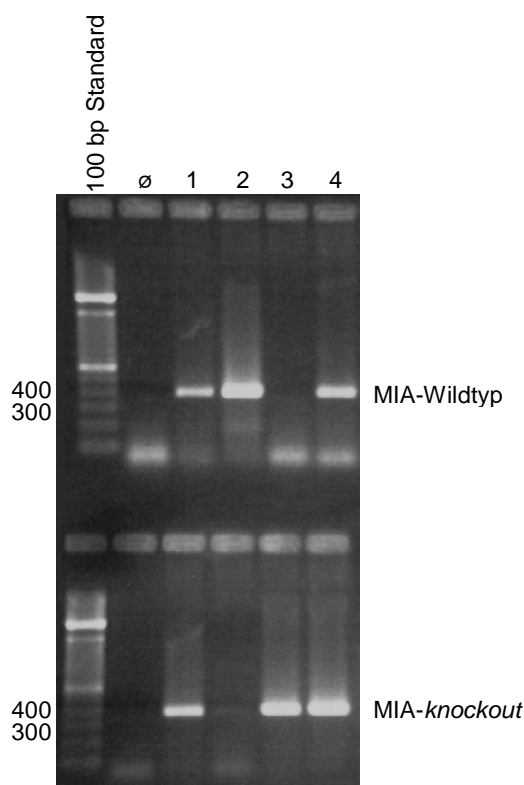


Abbildung 55: Beispiel für die Auswertung einer Genotypisierung auf MIA-Defizienz. Dargestellt ist eine Genotypisierung von Embryonen, entstanden aus einer Verpaarung mit MIA Heterozygoten Elterntieren. 10 µl der Genotypisierungs-PCR wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel per Elektrophorese aufgetrennt und die DNA in einer Ethidiumbromidlösung sichtbar gemacht. In der Negativkontrolle (ohne DNA-template) sind keine Banden sichtbar. Bei Embryo 1 und 4 handelt es sich um heterozygote Tiere, da in beiden PCR-Ansätzen eine spezifische Bande zu erkennen ist. Bei Embryo 2 handelt es sich um ein homozygoten Wildtyp-Tier, bei Embryo 3 um ein homozygoten MIA-knockout Tier.

5.3.8.5 Embryonen

Für die *in vivo* Untersuchung der Knorpelentwicklung an MIA-knockout-Mäusen wurden Schnitte von verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien anhand der *in situ* Hybridisierung (siehe 3.3.1) untersucht. Durch die Zeugung von Nachkommen aus

heterozygoten MIA-*knockout*-Elterntieren (siehe 5.3.8.3), war es möglich jeweils Wildtyp- mit homozygoten MIA-*knockout*-Embryonen innerhalb eines Wurfes zu vergleichen. Somit konnten phänotypische Unterschiede ausgelöst durch unterschiedliche Wurfgrößen, unterschiedliche Ernährungszustände der Muttertiere und Unterschiede im Befruchtungszeitpunkt minimiert werden. Hierfür wurde eine weibliche mit einer männlichen heterozygote MIA-*knockout*-Maus über Nacht von 17 Uhr abends bis 8 Uhr morgens verpaart. Am nächsten Tag wurden die Mäuse getrennt und das Weibchen auf vaginalen Plug untersucht. Bei positiven Plug wurde dieser Tag als Tag 0,5 nach der Begattung (0,5 dpc: days post coitum) bzw. als Tag 0,5 der Schwangerschaft betrachtet. Die trächtigen Tiere wurden an Tag 14,5, 15,5 und 16,5 der Schwangerschaft per Genickbruch getötet, die Embryonen aus dem Uterus entfernt, in PBS gewaschen, eine Schwanzspitzenbiospie für die Genotypisierung genommen (siehe 5.3.8.4) und in einer 4 % Formaldehyd/PBS-Lösung für die Herstellung von Paraffinmaterial (siehe 5.3.8.6) fixiert.

5.3.8.6 Herstellung von Paraffinmaterial

Für die *in situ* Hybridisierung an Schnitten von Mausembryonen (siehe 5.3.7) und für immunhistochemische Untersuchungen an Mausgewebe (siehe 5.3.4.6) wurden Paraffinpräparate hergestellt. Die präparierten Mausgewebe wurden zunächst in 1x PBS gewaschen und in Einbettkassetten für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer 4 % Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Knochenhaltige Präparate von adulten Mäusen wurden zur Entkalkifizierung zusätzlich für etwa sieben Tage in einer EDTA-Lösung (0,8 M, pH 7,4) inkubiert. Danach wurden die Gewebe in einem Shandon Gewebeeinbettautomat Hypercenter XP wie folgt behandelt:

Lösung	Dauer, Temperatur
4 % Formaldehyd/PBS-Lösung	90 min
Ethanol 70 %	30 min
Ethanol 70 %	60 min
Ethanol 96 %	60 min
Ethanol 96 %	30 min
Isopropanol 100 %	50 min
Isopropanol 100 %	50 min
Isopropanol 100 %	90 min
Xylol	50 min
Xylol	50 min
Paraffin	30 min, 60 °C

Paraffin	30 min, 60 °C
Paraffin	60 min, 60 °C
Paraffin	60 min, 60 °C

Beim Shandon Hypercenter XP handelt es sich um ein computergesteuertes System in dem Gewebe für immunhistochemische Anwendungen automatisch fixiert, dehydriert, gesäubert und mit Paraffin infiltriert werden. Nach der Dehydrierung wurde das Gewebematerial in Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert. Für immunhistochemische Färbungen und für die *in situ* Hybridisierung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 2 µm Dünnschnitte von Martina Waeber (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) hergestellt, auf Superfrost® Plus Objektträger aufgetragen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

5.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism® 4.03 Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA). Alle Experimente wurden jeweils in mindestens zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Die Berechnung auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels des Student's t-Tests ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Hierbei gilt: ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Eigene Publikationen

Schmid R., Meyer K., Spang R., Schitteck B., Bosserhoff A.K.: YBX1 is a modulator in MIA/CD-RAP-dependent chondrogenesis. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Schmid R., and Bosserhoff A.K.: Redundancy in regulation of chondrogenesis in MIA/CD-RAP-deficient mice. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Schmid R., Meyer K., Spang R., Schitteck B., Bosserhoff A.K.: Melanoma inhibitory activity promotes melanoma development through activation of YBX1. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2013 May; [Epub ahead of print]

Schmid R.*, Schiffner S.*, Zimara N.*, Bosserhoff A.K.: p54^{nrb} is a new regulator of progression of malignant melanoma. *Carcinogenesis*. 2011 Aug; Vol. **32** No.8:1176-82

Schmid R., Schiffner S., Opolka A., Grässel S., Schubert T., Moser M., Bosserhoff A.K.: Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice. *Cell Death & Disease*. 2010 Nov 11; Vol. **1**:e97

Schubert T., Schlegel J., **Schmid R.**, Opolka A., Grassel S., Humphries M., Bosserhof A.K.: Modulation of cartilage differentiation by melanoma inhibiting activity/cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (MIA/CD-RAP). *Experimental & Molecular Medicine*. 2010 March 31; Vol. **42** No.3: 166–174

* gleichberechtigte Autoren

Literaturverzeichnis

- Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A. and Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo Journal* 1997, **16** (13): 3797-3804.
- Abou-Samra A. B., Jueppner H., Westerberg D., Potts J. T., Jr. and Segre G. V. Parathyroid hormone causes translocation of protein kinase-C from cytosol to membranes in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1989, **124** (3): 1107-1113.
- Abou-Samra A. B., Jueppner H., Force T., Freeman M. W., Kong X. F., Schipani E., Urena P., Richards J., Bonventre J. V., Potts J. T., Jr. and et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89** (7): 2732-2736.
- Adams C. S. and Shapiro I. M. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002, **13** (6): 465-473.
- Ahrens P. B., Solursh M. and Reiter R. S. Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol* 1977, **60** (1): 69-82.
- Akiyama H., Chaboissier M. C., Martin J. F., Schedl A. and de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 2002, **16** (21): 2813-2828.
- Amano K., Hata K., Muramatsu S., Wakabayashi M., Takigawa Y., Ono K., Nakanishi M., Takashima R., Kogo M., Matsuda A., Nishimura R. and Yoneda T. Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell* 2011, **22** (8): 1300-1311.
- Amano K., Hata K., Sugita A., Takigawa Y., Ono K., Wakabayashi M., Kogo M., Nishimura R. and Yoneda T. Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein. *Mol Biol Cell* 2009, **20** (21): 4541-4551.
- Amizuka N., Henderson J. E., Hoshi K., Warshawsky H., Ozawa H., Goltzman D. and Karaplis A. C. Programmed cell death of chondrocytes and aberrant chondrogenesis in mice homozygous for parathyroid hormone-related peptide gene deletion. *Endocrinology* 1996, **137** (11): 5055-5067.
- Anderson H. C. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 2003, **5** (3): 222-226.
- Angers S. and Moon R. T. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10** (7): 468-477.
- Arndt S. and Bosserhoff A. K. TANGO is a tumor suppressor of malignant melanoma. *Int J Cancer* 2006, **119** (12): 2812-2820.
- Arndt S. and Bosserhoff A. K. Reduced expression of TANGO in colon and hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep* 2007, **18** (4): 885-891.
- Asahina I., Sampath T. K. and Hauschka P. V. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 1996, **222** (1): 38-47.
- Balcerzak M., Hamade E., Zhang L., Pikula S., Azzar G., Radisson J., Bendorowicz-Pikula J. and Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 2003, **50** (4): 1019-1038.

- Ballock R. T., Heydemann A., Wakefield L. M., Flanders K. C., Roberts A. B. and Sporn M. B. TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* 1993, **158** (2): 414-429.
- Bargou R. C., Jurchott K., Wagener C., Bergmann S., Metzner S., Bommert K., Mapara M. Y., Winzer K. J., Dietel M., Dorken B. and Royer H. D. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 1997, **3** (4): 447-450.
- Basaki Y., Hosoi F., Oda Y., Fotovati A., Maruyama Y., Oie S., Ono M., Izumi H., Kohno K., Sakai K., Shimoyama T., Nishio K. and Kuwano M. Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene* 2007, **26** (19): 2736-2746.
- Basu A., Dong B., Krainer A. R. and Howe C. C. The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54nrb/NonO. *Mol Cell Biol* 1997, **17** (2): 677-686.
- Bauer R., Humphries M., Fassler R., Winklmeier A., Craig S. E. and Bosserhoff A. K. Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem* 2006, **281** (177): 11669-11677.
- Bawden J. W. Calcium transport during mineralization. *Anat Rec* 1989, **224** (2): 226-233.
- Beier F., Ali Z., Mok D., Taylor A. C., Leask T., Albanese C., Pestell R. G. and LuValle P. TGFbeta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Mol Biol Cell* 2001, **12** (12): 3852-3863.
- Beier F., Leask T. A., Haque S., Chow C., Taylor A. C., Lee R. J., Pestell R. G., Ballock R. T. and LuValle P. Cell cycle genes in chondrocyte proliferation and differentiation. *Matrix Biol* 1999, **18** (2): 109-120.
- Beier F. and LuValle P. The cyclin D1 and cyclin A genes are targets of activated PTH/PTHrP receptors in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *Mol Endocrinol* 2002, **16** (9): 2163-2173.
- Bell D. M., Leung K. K., Wheatley S. C., Ng L. J., Zhou S., Ling K. W., Sham M. H., Koopman P., Tam P. P. and Cheah K. S. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 1997, **16** (2): 174-178.
- Bellini A. and Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* 2007, **87** (9): 858-870.
- Bengtsson T., Aszodi A., Nicolae C., Hunziker E. B., Lundgren-Akerlund E. and Fassler R. Loss of alpha10beta1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes. *J Cell Sci* 2005, **118** (Pt 5): 929-936.
- Bennett V. D., Pallante K. M. and Adams S. L. The splicing pattern of fibronectin mRNA changes during chondrogenesis resulting in an unusual form of the mRNA in cartilage. *J Biol Chem* 1991, **266** (9): 5918-5924.
- Bi W., Deng J. M., Zhang Z., Behringer R. R. and de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 1999, **22** (1): 85-89.
- Bi W., Huang W., Whitworth D. J., Deng J. M., Zhang Z., Behringer R. R. and de Crombrughe B. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98** (12): 6698-6703.
- Birnboim H. C. and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979, **7** (6): 1513-1523.
- Blesch A., Bosserhoff A. K., Apfel R., Behl C., Hessdoerfer B., Schmitt A., Jachimczak P., Lottspeich F., Buettner R. and Bogdahn U. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res* 1994, **54** (21): 5695-5701.

- Bogdahn U., Apfel R., Hahn M., Gerlach M., Behl C., Hoppe J. and Martin R. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res* 1989, **49** (19): 5358-5363.
- Borzi R. M., Mazzetti I., Macor S., Silvestri T., Bassi A., Cattini L. and Facchini A. Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 1999, **455** (3): 238-242.
- Boskey A. L., Paschalis E. P., Binderman I. and Doty S. B. BMP-6 accelerates both chondrogenesis and mineral maturation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures. *J Cell Biochem* 2002, **84** (3): 509-519.
- Bosserhoff A. K. and Buettner R. Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation. *Biomaterials* 2003, **24** (19): 3229-3234.
- Bosserhoff A. K., Dreau D., Hein R., Landthaler M., Holder W. D. and Buettner R. Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res* 2001a, **158**: 158-168.
- Bosserhoff A. K., Echtenacher B., Hein R. and Buettner R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res* 2001b, **11** (4): 417-421.
- Bosserhoff A. K., Hein R., Bogdahn U. and Buettner R. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem* 1996, **271** (1): 490-495.
- Bosserhoff A. K., Kaufmann M., Kaluza B., Bartke I., Zirngibl H., Hein R., Stolz W. and Buettner R. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res* 1997a, **57** (15): 3149-3153.
- Bosserhoff A. K., Kondo S., Moser M., Dietz U. H., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Buettner R. and Sandell L. J. Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev Dyn* 1997b, **208** (4): 516-525.
- Bosserhoff A. K., Lederer M., Kaufmann M., Hein R., Stolz W., Apfel R., Bogdahn U. and Buettner R. MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Anticancer Res* 1999a, **19** (4A): 2691-2693.
- Bosserhoff A. K., Moser M. and Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr Patterns* 2004, **4** (4): 473-479.
- Bosserhoff A. K., Moser M., Hein R., Landthaler M. and Buettner R. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol* 1999b, **187** (4): 446-454.
- Bosserhoff A. K., Moser M., Scholmerich J., Buettner R. and Hellerbrand C. Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003a, **278** (17): 15225-15231.
- Bosserhoff A. K., Stoll R., Sleeman J. P., Bataille F., Buettner R. and Holak T. A. Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest* 2003b, **83** (11): 1583-1594.
- Bradley E. W. and Drissi M. H. WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol Endocrinol* 2010, **24** (8): 1581-1593.
- Bridgewater L. C., Lefebvre V. and de Crombrughe B. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem* 1998, **273** (24): 14998-15006.

- Brockhoff G. DNA-und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. In: *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* U. Sack, A. Tárnok and G. Rothe (Ed.). Basel. Karger 2007: 604-646.
- Buckwalter J. A., Mower D., Ungar R., Schaeffer J. and Ginsberg B. Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* 1986, **68** (2): 243-255.
- Bush P. G., Parisinos C. A. and Hall A. C. The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *J Cell Physiol* 2008, **214** (3): 621-629.
- Bush P. G., Pritchard M., Loqman M. Y., Damron T. A. and Hall A. C. A key role for membrane transporter NKCC1 in mediating chondrocyte volume increase in the mammalian growth plate. *J Bone Miner Res* 2010, **25** (7): 1594-1603.
- Camper L., Hellman U. and Lundgren-Akerlund E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem* 1998, **273** (32): 20383-20389.
- Camper L., Holmval K., Wangnerud C., Aszodi A. and Lundgren-Akerlund E. Distribution of the collagen-binding integrin alpha10beta1 during mouse development. *Cell Tissue Res* 2001, **306** (1): 107-116.
- Caplan A. I. and Boyan B. D. In: *Bone*. B. K. Hall (Ed.). Boca Raton, FL, USA. CRC Press 1994: 1-46.
- Caplan A. I. and Pechak D. G. The cellular and molecular embryology of bone formation. In: *Bone and mineral research*. W. A. Peck (Ed.). New York, NY, USA. Elsevier. **5** 1987: 117-183.
- Cawston T. E. and Wilson A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20** (5): 983-1002.
- Centrella M., Horowitz M. C., Wozney J. M. and McCarthy T. L. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994, **15** (1): 27-39.
- Chen L. L. and Carmichael G. G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol Cell* 2009, **35** (4): 467-478.
- Chothia C. and Jones E. Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* 1997, **66**: 823-862.
- Chung U. I., Lanske B., Lee K., Li E. and Kronenberg H. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95** (22): 13030-13035.
- Chung U. I., Schipani E., McMahon A. P. and Kronenberg H. M. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 2001, **107** (3): 295-304.
- Chuong C. M., Widelitz R. B., Jiang T. X., Abbott U. K., Lee Y. S. and Chen H. M. Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Prog Clin Biol Res* 1993, **383B**: 465-474.
- Coelho C. N. and Kosher R. A. Gap junctional communication during limb cartilage differentiation. *Dev Biol* 1991, **144** (1): 47-53.

- Cohen-Salmon M., Frenz D., Liu W., Verpy E., Voegelings S. and Petit C. Fdp, a new fibrocyte-derived protein related to MIA/CD-RAP, has an in vitro effect on the early differentiation of the inner ear mesenchyme. *J Biol Chem* 2000, **275** (51): 40036-40041.
- Colvin J. S., Bohne B. A., Harding G. W., McEwen D. G. and Ornitz D. M. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1996, **12** (4): 390-397.
- Connor F., Cary P. D., Read C. M., Preston N. S., Driscoll P. C., Denny P., Crane-Robinson C. and Ashworth A. DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res* 1994, **22** (16): 3339-3346.
- Davidson R. L. and Kaufman E. R. Resistance to bromodeoxyuridine mutagenesis and toxicity in mammalian cells selected for resistance to hydroxyurea. *Somatic Cell Genet* 1979, **5** (6): 873-885.
- Davies S. R., Sakano S., Zhu Y. and Sandell L. J. Distribution of the transcription factors Sox9, AP-2, and [delta]EF1 in adult murine articular and meniscal cartilage and growth plate. *J Histochem Cytochem* 2002, **50** (8): 1059-1065.
- Day T. F., Guo X., Garrett-Beal L. and Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005, **8** (5): 739-750.
- Deng C., Wynshaw-Boris A., Zhou F., Kuo A. and Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 1996, **84** (6): 911-921.
- Denker A. E., Nicoll S. B. and Tuan R. S. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation* 1995, **59** (1): 25-34.
- Dessau W., von der Mark H., von der Mark K. and Fischer S. Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1980, **57**: 51-60.
- Dietz U. H. and Sandell L. J. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem* 1996, **271** (1): 3311-3316.
- Dignam J. D., Lebovitz R. M. and Roeder R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983, **11** (5): 1475-1489.
- Dong B., Horowitz D. S., Kobayashi R. and Krainer A. R. Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJ6. *Nucleic Acids Res* 1993, **21** (17): 4085-4092.
- Dong Y. F., Soung do Y., Schwarz E. M., O'Keefe R. J. and Drissi H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 2006, **208** (1): 77-86.
- Ducy P., Starbuck M., Priemel M., Shen J., Pinero G., Geoffroy V., Amling M. and Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999, **13** (8): 1025-1036.
- Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A. L. and Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997, **89** (5): 747-754.
- Duprez D., Bell E. J., Richardson M. K., Archer C. W., Wolpert L., Brickell P. M. and Francis-West P. H. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev* 1996a, **57** (2): 145-157.

- Duprez D. M., Coltey M., Amthor H., Brickell P. M. and Tickle C. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol* 1996b, **174** (2): 448-452.
- Eames B. F., Sharpe P. T. and Helms J. A. Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Dev Biol* 2004, **274** (1): 188-200.
- Echelard Y., Epstein D. J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A. and McMahon A. P. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993, **75** (7): 1417-1430.
- Ede D. Cellular condensations and chondrogenesis. In: *Cartilage: Development, Differentiation, and Growth*. B. K. Hall (Ed.). New York, NY, USA. Academic Press 1983: 143-185.
- Edelman G. M. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol* 1986, **2**: 81-116.
- Einhorn T. A., Majeska R. J., Mohaideen A., Kagel E. M., Boussein M. L., Turek T. J. and Wozney J. M. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A** (8): 1425-1435.
- El Fitori J., Kleeff J., Giese N. A., Guweidhi A., Bosserhoff A. K., Buchler M. W. and Friess H. Melanoma Inhibitory Activity (MIA) increases the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int* 2005, **5** (1): 3.
- Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., Nomura S., Himeno M., Kitamura Y., Kishimoto T. and Komori T. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 2000, **275** (12): 8695-8702.
- Enomoto M., Leboy P. S., Menko A. S. and Boettiger D. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res* 1993, **205** (2): 276-285.
- Erlebacher A., Filvaroff E. H., Gitelman S. E. and Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995, **80** (3): 371-378.
- Evdokimova V., Ruzanov P., Imataka H., Raught B., Svitkin Y., Ovchinnikov L. P. and Sonenberg N. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J* 2001, **20** (19): 5491-5502.
- Fagotto F., Gluck U. and Gumbiner B. M. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 1998, **8** (4): 181-190.
- Fell H. B. The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J Morphol* 1925, **40**: 417-451.
- Feng W. and Williams T. Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 2003, **24** (2): 460-475.
- Forsyth C. B., Pulai J. and Loeser R. F. Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2002, **46** (9): 2368-2376.
- Fosang A. J., Last K., Knauper V., Murphy G. and Neame P. J. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 1996, **380** (1-2): 17-20.
- Foster J. W., Dominguez-Steglich M. A., Guioli S., Kwok C., Weller P. A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I. D., Goodfellow P. N. and et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994, **372** (6506): 525-530.

- Franzen P., ten Dijke P., Ichijo H., Yamashita H., Schulz P., Heldin C. H. and Miyazono K. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 1993, **75** (4): 681-692.
- Frenz D. A., Jaikaria N. S. and Newman S. A. The mechanism of precartilage mesenchymal condensation: a major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev Biol* 1989, **136** (1): 97-103.
- Gehris A. L., Oberlender S. A., Shepley K. J., Tuan R. S. and Bennett V. D. Fibronectin mRNA alternative splicing is temporally and spatially regulated during chondrogenesis in vivo and in vitro. *Developmental Dynamics* 1996, **206** (2): 219-230.
- Gehris A. L., Stringa E., Spina J., Desmond M. E., Tuan R. S. and Bennett V. D. The region encoded by the alternatively spliced exon IIIA in mesenchymal fibronectin appears essential for chondrogenesis at the level of cellular condensation. *Dev Biol* 1997, **190** (2): 191-205.
- Gerber H. P., Vu T. H., Ryan A. M., Kowalski J., Werb Z. and Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999, **5** (6): 623-628.
- Gibson G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech* 1998, **43** (2): 191-204.
- Gilbert S. F. *Developmental Biology*. Sunderland, MA, USA. Sinauer Associates, Inc. 1997.
- Gimenez-Bonafe P., Fedoruk M. N., Whitmore T. G., Akbari M., Ralph J. L., Ettinger S., Gleave M. E. and Nelson C. C. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate* 2004, **59** (3): 337-349.
- Glasson S. S., Askew R., Sheppard B., Carito B., Blanchet T., Ma H. L., Flannery C. R., Peluso D., Kanki K., Yang Z., Majumdar M. K. and Morris E. A. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005, **434** (7033): 644-648.
- Glumoff V., Savontaus M., Vehanen J. and Vuorio E. Analysis of aggrecan and tenascin gene expression in mouse skeletal tissues by northern and in situ hybridization using species specific cDNA probes. *Biochim Biophys Acta* 1994, **1219** (3): 613-622.
- Goldring M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012, **4** (4): 269-285.
- Goldring M. B. and Goldring S. R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007, **213** (3): 626-634.
- Goodrich L. V., Johnson R. L., Milenkovic L., McMahon J. A. and Scott M. P. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* 1996, **10** (3): 301-312.
- Grandolfo M., D'Andrea P., Martina M., Ruzzier F. and Vittur F. Calcium-activated potassium channels in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **182** (3): 1429-1434.
- Grant C. E. and Deeley R. G. Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol* 1993, **13** (7): 4186-4196.
- Gu C., Oyama T., Osaki T., Kohno K. and Yasumoto K. Expression of Y box-binding protein-1 correlates with DNA topoisomerase IIalpha and proliferating cell nuclear antigen expression in lung cancer. *Anticancer Res* 2001, **21** (4A): 2357-2362.
- Guba M., Bosserhoff A. K., Steinbauer M., Abels C., Anthuber M., Buettner R. and Jauch K. W. Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer* 2000, **83** (9): 1216-1222.
- Guo J., Chung U. I., Yang D., Karsenty G., Bringham F. R. and Kronenberg H. M. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* 2006, **292** (1): 116-128.

- Guo X., Mak K. K., Taketo M. M. and Yang Y. The Wnt/beta-catenin pathway interacts differentially with PTHrP signaling to control chondrocyte hypertrophy and final maturation. *PLoS One* 2009, **4** (6): e6067.
- Haaijman A., Burger E. H., Goei S. W., Nelles L., ten Dijke P., Huylebroeck D. and Bronckers A. L. Correlation between ALK-6 (BMPR-IB) distribution and responsiveness to osteogenic protein-1 (BMP-7) in embryonic mouse bone rudiments. *Growth Factors* 2000, **17** (3): 177-192.
- Haigh J. J., Gerber H. P., Ferrara N. and Wagner E. F. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 2000, **127** (7): 1445-1453.
- Hale J. E., Fraser J. D. and Price P. A. The Identification of Matrix Gla Protein in Cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 1988, **263** (12): 5820-5824.
- Hall B. K. The Embryonic-Development of Bone. *American Scientist* 1988, **76** (2): 174-181.
- Harley V. R., Lovell-Badge R. and Goodfellow P. N. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 1994, **22** (8): 1500-1501.
- Hartmann C. Transcriptional networks controlling skeletal development. *Current Opinion in Genetics & Development* 2009, **19** (5): 437-443.
- Hascall V. C., Oegema T. R., Brown M. and Caplan A. I. Isolation and Characterization of Proteoglycans from Chick Limb Bud Chondrocytes Grown Invitro. *Journal of Biological Chemistry* 1976, **251** (11): 3511-3519.
- Hata K., Nishimura R., Muramatsu S., Matsuda A., Matsubara T., Amano K., Ikeda F., Harley V. R. and Yoneda T. Paraspeckle protein p54nrb links Sox9-mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008, **118** (9): 3098-3108.
- Hellerbrand C., Amann T., Schlegel J., Wild P., Bataille F., Spruss T., Hartmann A. and Bosserhoff A. K. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2008, **57** (2): 243-251.
- Hellerbrand C., Bataille F., Schlegel J., Hartmann A., Muhlbauer M., Scholmerich J., Buttner R., Hofstadter F. and Bosserhoff A. K. In situ expression patterns of melanoma inhibitory activity 2 in healthy and diseased livers. *Liver Int* 2005, **25** (2): 357-366.
- Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 1984, **28** (3): 351-359.
- Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D. and Loening S. A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1997, **25** (19): 3957-3958.
- Hickok N. J., Haas A. R. and Tuan R. S. Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech* 1998, **43** (2): 174-190.
- Higashi K., Inagaki Y., Suzuki N., Mitsui S., Mauviel A., Kaneko H. and Nakatsuka I. Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma. *J Biol Chem* 2003, **278** (7): 5156-5162.
- Higashikawa A., Saito T., Ikeda T., Kamekura S., Kawamura N., Kan A., Oshima Y., Ohba S., Ogata N., Takeshita K., Nakamura K., Chung U. I. and Kawaguchi H. Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum* 2009, **60** (1): 166-178.
- Hill T. P., Spater D., Taketo M. M., Birchmeier W. and Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 2005, **8** (5): 727-738.
- Hinchcliffe J. R. and Johnson D. R. *The Development of the Vertebrate Limb*. Oxford, UK. Oxford University Press 1980.

- Holm P. S., Bergmann S., Jurchott K., Lage H., Brand K., Ladhoff A., Mantwill K., Curiel D. T., Döbelstein M., Dietel M., Gansbacher B. and Royer H. D. YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J Biol Chem* 2002, **277** (12): 10427-10434.
- Horton W. A. The biology of bone growth. *Growth Genet Horm* 1990, **6**: 1-3.
- Horton W. A. Cartilage morphology. In: *Extracellular Matrix and Heritable Disorder of Connective Tissue*. P. M. Royce and B. Steinman (Ed.). New York. Alan R. Liss 1993: 73-84.
- Houston C. S., Opitz J. M., Spranger J. W., Macpherson R. I., Reed M. H., Gilbert E. F., Herrmann J. and Schinzel A. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am J Med Genet* 1983, **15** (1): 3-28.
- Hovmöller M. L., Osuna A., Eklof O., Fredga K., Hjerpe A., Linsten J., Ritzen M., Stănescu V. and Svénningsen N. Campomelic dwarfism. A genetically determined mesenchymal disorder combined with sex reversal. *Hereditas* 1977, **86** (1): 51-62.
- Huang Z., Xu H. and Sandell L. Negative regulation of chondrocyte differentiation by transcription factor AP-2alpha. *J Bone Miner Res* 2004, **19** (2): 245-255.
- Huber O., Korn R., McLaughlin J., Ohsugi M., Herrmann B. G. and Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 1996, **59** (1): 3-10.
- Humphries M. J. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8** (5): 632-640.
- Humphries M. J. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000, **28** (4): 311-339.
- Hung I. H., Yu K., Lavine K. J. and Ornitz D. M. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev Biol* 2007, **307** (2): 300-313.
- Iannotti J. P., Naidu S., Noguchi Y., Hunt R. M. and Brighton C. T. Growth plate matrix vesicle biogenesis. The role of intracellular calcium. *Clin Orthop Relat Res* 1994, (306): 222-229.
- Iida-Klein A., Varlotta V. and Hahn T. J. Protein kinase C activity in UMR-106-01 cells: effects of parathyroid hormone and insulin. *J Bone Miner Res* 1989, **4** (5): 767-774.
- Ikeda T., Kamekura S., Mabuchi A., Kou I., Seki S., Takato T., Nakamura K., Kawaguchi H., Ikegawa S. and Chung U. I. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 2004, **50** (11): 3561-3573.
- Ikeda T., Kawaguchi H., Kamekura S., Ogata N., Mori Y., Nakamura K., Ikegawa S. and Chung U. I. Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 2005, **23** (5): 337-340.
- Inada M., Wang Y., Byrne M. H., Rahman M. U., Miyaura C., Lopez-Otin C. and Krane S. M. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101** (49): 17192-17197.
- Inada M., Yasui T., Nomura S., Miyake S., Deguchi K., Himeno M., Sato M., Yamagiwa H., Kimura T., Yasui N., Ochi T., Endo N., Kitamura Y., Kishimoto T. and Komori T. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn* 1999, **214** (4): 279-290.
- Ionescu A. M., Schwarz E. M., Vinson C., Puzas J. E., Rosier R., Reynolds P. R. and O'Keefe R. J. PTHrP modulates chondrocyte differentiation through AP-1 and CREB signaling. *J Biol Chem* 2001, **276** (15): 11639-11647.

- Ish-Horowicz D. and Burke J. F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 1981, **9** (13): 2989-2998.
- Iwamoto M., Kitagaki J., Tamamura Y., Gentili C., Koyama E., Enomoto H., Komori T., Pacifici M. and Enomoto-Iwamoto M. Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11** (1): 6-15.
- Janners M. Y. and Searls R. L. Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing. *Dev Biol* 1970, **23** (1): 136-165.
- Jimenez M. J., Balbin M., Lopez J. M., Alvarez J., Komori T. and Lopez-Otin C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 1999, **19** (6): 4431-4442.
- Jin E. J., Choi Y. A., Sonn J. K. and Kang S. S. Suppression of ADAM 10-induced delta-1 shedding inhibits cell proliferation during the chondro-inhibitory action of TGF-beta 3. *Molecules and Cells* 2007, **24** (1): 139-147.
- Juppner H., Abou-Samra A. B., Freeman M., Kong X. F., Schipani E., Richards J., Kolakowski L. F., Jr., Hock J., Potts J. T., Jr., Kronenberg H. M. and et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991, **254** (5034): 1024-1026.
- Jurchott K., Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M. and Royer H. D. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 2003, **278** (30): 27988-27996.
- Kamekura S., Kawasaki Y., Hoshi K., Shimoaka T., Chikuda H., Maruyama Z., Komori T., Sato S., Takeda S., Karsenty G., Nakamura K., Chung U. I. and Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 2006, **54** (8): 2462-2470.
- Karaplis A. C., Luz A., Glowacki J., Bronson R. T., Tybulewicz V. L., Kronenberg H. M. and Mulligan R. C. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* 1994, **8** (3): 277-289.
- Karp S. J., Schipani E., St-Jacques B., Hunzelman J., Kronenberg H. and McMahon A. P. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* 2000, **127** (3): 543-548.
- Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, **9**: 183-196.
- Katagiri T., Yamaguchi A., Ikeda T., Yoshiki S., Wozney J. M., Rosen V., Wang E. A., Tanaka H., Omura S. and Suda T. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **172** (1): 295-299.
- Kaufman E. R. and Davidson R. L. Biological and biochemical effects of bromodeoxyuridine and deoxycytidine on Syrian hamster melanoma cells. *Somatic Cell Genet* 1978, **4** (5): 587-601.
- Kelley R. O. and Fallon J. F. Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of the developing chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol* 1978, **46**: 99-110.
- Kelley R. O. and Fallon J. F. A freeze-fracture and morphometric analysis of gap junctions of limb bud cells: initial studies on a possible mechanism for morphogenetic signalling during development. *Prog Clin Biol Res* 1983, **110 Pt A**: 119-130.
- Kim I. S., Otto F., Zabel B. and Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 1999, **80** (2): 159-170.

- King J. A., Marker P. C., Seung K. J. and Kingsley D. M. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol* 1994, **166** (1): 112-122.
- Kingsley D. M., Bland A. E., Grubber J. M., Marker P. C., Russell L. B., Copeland N. G. and Jenkins N. A. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 1992, **71** (3): 399-410.
- Knudson C. B. and Toole B. P. Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev Biol* 1985, **112** (2): 308-318.
- Knudson C. B. and Toole B. P. Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm. *Dev Biol* 1987, **124** (1): 82-90.
- Kobayashi T., Nakamura E., Shimizu Y., Terada N., Maeno A., Kobori G., Kamba T., Kamoto T., Ogawa O. and Inoue T. Restoration of cyclin D2 has an inhibitory potential on the proliferation of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **387** (1): 196-201.
- Kobayashi T. and Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002, **68-69**: 557-573.
- Kohno K., Izumi H., Uchiumi T., Ashizuka M. and Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003, **25** (7): 691-698.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R. T., Gao Y. H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S. and Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997, **89** (5): 755-764.
- Korinek V., Barker N., Willert K., Molenaar M., Roose J., Wagenaar G., Markman M., Lamers W., Destree O. and Clevers H. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* 1998, **18** (3): 1248-1256.
- Kosher R. A., Kulyk W. M. and Gay S. W. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol* 1986, **102** (4): 1151-1156.
- Kosher R. A., Walker K. H. and Ledger P. W. Temporal and spatial distribution of fibronectin during development of the embryonic chick limb bud. *Cell Differ* 1982, **11** (4): 217-228.
- Kozhemyakina E., Cohen T., Yao T. P. and Lassar A. B. Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Mol Cell Biol* 2009, **29** (21): 5751-5762.
- Kramer R. H. and Marks N. Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem* 1989, **264** (8): 4684-4688.
- Kravis D. and Upholt W. B. Quantitation of type II procollagen mRNA levels during chick limb cartilage differentiation. *Dev Biol* 1985, **108** (1): 164-172.
- Kretzschmar M. and Massague J. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Current Opinion in Genetics & Development* 1998, **8** (1): 103-111.
- Kronenberg H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003, **423** (6937): 332-336.
- Kronenberg H. M., Lee K., Lanske B. and Segre G. V. Parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog control the pace of cartilage differentiation. *J Endocrinol* 1997, **154 Suppl**: 39-45.
- Kubbies M. High-Resolution Cell Cycle Analysis: The Flow Cytometric Bromodeoxyuridine-Hoechst Quenching Technique. In: *Flow Cytometry and Cell Sorting*. A. Radbruch (Ed.). Heidelberg. Springer 1999: 112-124.

- Kulyk W. M., Coelho C. N. and Kosher R. A. Type IX collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *Matrix* 1991, **11** (4): 282-288.
- Kulyk W. M., Rodgers B. J., Greer K. and Kosher R. A. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev Biol* 1989a, **135** (2): 424-430.
- Kulyk W. M., Upholt W. B. and Kosher R. A. Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development* 1989b, **106** (3): 449-455.
- Kwok C., Weller P. A., Guioli S., Foster J. W., Mansour S., Zuffardi O., Punnett H. H., Dominguez-Steglich M. A., Brook J. D., Young I. D. and et al. Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am J Hum Genet* 1995, **57** (5): 1028-1036.
- Kwon T. G., Zhao X., Yang Q., Li Y., Ge C. X., Zhao G. S. and Franceschi R. T. Physical and Functional Interactions Between Runx2 and HIF-1 alpha Induce Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression. *J Cell Biochem* 2011, **112** (12): 3582-3593.
- Ladomery M. and Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* 1995, **17** (1): 9-11.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227** (5259): 680-685.
- Lanske B., Karaplis A. C., Lee K., Luz A., Vortkamp A., Pirro A., Karperien M., Defize L. H., Ho C., Mulligan R. C., Abou-Samra A. B., Juppner H., Segre G. V. and Kronenberg H. M. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996, **273** (5275): 663-666.
- Laudet V., Stehelin D. and Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 1993, **21** (10): 2493-2501.
- Lee K., Lanske B., Karaplis A. C., Deeds J. D., Kohno H., Nissenson R. A., Kronenberg H. M. and Segre G. V. Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology* 1996, **137** (11): 5109-5118.
- Lefebvre V. Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab* 2002, **20** (3): 121-130.
- Lefebvre V., Behringer R. R. and de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9 Suppl A**: S69-75.
- Lefebvre V., Huang W., Harley V. R., Goodfellow P. N. and de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997, **17** (4): 2336-2346.
- Lefebvre V., Li P. and de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 1998, **17** (19): 5718-5733.
- Lefebvre V. and Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005, **75** (3): 200-212.
- Lefebvre V., Zhou G., Mukhopadhyay K., Smith C. N., Zhang Z., Eberspaecher H., Zhou X., Sinha S., Maity S. N. and de Crombrughe B. An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes. *Mol Cell Biol* 1996, **16** (8): 4512-4523.

- Lengner C. J., Hassan M. Q., Serra R. W., Lepper C., van Wijnen A. J., Stein J. L., Lian J. B. and Stein G. S. Nkx3.2-mediated repression of Runx2 promotes chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* 2005, **280** (16): 15872-15879.
- Levanon D., Brenner O., Negreanu V., Bettoun D., Woolf E., Eilam R., Lotem J., Gat U., Otto F., Speck N. and Groner Y. Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2001, **109** (2): 413-417.
- Li T. F., Dong Y., Ionescu A. M., Rosier R. N., Zuscik M. J., Schwarz E. M., O'Keefe R. J. and Drissi H. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) inhibits Runx2 expression through the PKA signaling pathway. *Exp Cell Res* 2004a, **299** (1): 128-136.
- Li T. F., Zuscik M. J., Ionescu A. M., Zhang X., Rosier R. N., Schwarz E. M., Drissi H. and O'Keefe R. J. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp Cell Res* 2004b, **300** (1): 159-169.
- Lian J. B., Balint E., Javed A., Drissi H., Vitti R., Quinlan E. J., Zhang L., Van Wijnen A. J., Stein J. L., Speck N. and Stein G. S. Runx1/AML1 hematopoietic transcription factor contributes to skeletal development in vivo. *J Cell Physiol* 2003, **196** (2): 301-311.
- Lin H. Y., Wang X. F., Ng-Eaton E., Weinberg R. A. and Lodish H. F. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992, **68** (4): 775-785.
- Linsenmayer T. F., Toole B. P. and Trelstad R. L. Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. *Dev Biol* 1973a, **35** (2): 232-239.
- Linsenmayer T. F., Trelstad R. L., Toole B. P. and Gross J. The collagen of osteogenic cartilage in the embryonic chick. *Biochem Biophys Res Commun* 1973b, **52** (3): 870-876.
- Liu Y., Li H., Tanaka K., Tsumaki N. and Yamada Y. Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J Biol Chem* 2000, **275** (17): 12712-12718.
- Liu Z., Xu J., Colvin J. S. and Ornitz D. M. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 2002, **16** (7): 859-869.
- Logan C. Y. and Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**: 781-810.
- Long F., Schipani E., Asahara H., Kronenberg H. and Montminy M. The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development* 2001a, **128** (4): 541-550.
- Long F., Zhang X. M., Karp S., Yang Y. and McMahon A. P. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 2001b, **128** (24): 5099-5108.
- Lougheed J. C., Holton J. M., Alber T., Bazan J. F. and Handel T. M. Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98** (10): 5515-5520.
- Lu Z. H., Books J. T. and Ley T. J. YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol* 2005, **25** (11): 4625-4637.
- Lu Z. H., Books J. T. and Ley T. J. Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Mol Cell Biol* 2006, **26** (22): 8410-8417.
- Luckman S. P., Rees E. and Kwan A. P. Partial characterization of cell-type X collagen interactions. *Biochem J* 2003, **372** (Pt 2): 485-493.

- Luo G. B., Dsouza R., Hogue D. and Karsenty G. The Matrix Gla Protein Gene Is a Marker of the Chondrogenesis Cell Lineage during Mouse Development. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995, **10** (2): 325-334.
- Lyons K. M., Hogan B. L. and Robertson E. J. Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev* 1995, **50** (1): 71-83.
- Lyons K. M., Pelton R. W. and Hogan B. L. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev* 1989, **3** (11): 1657-1668.
- Macias D., Ganan Y., Sampath T. K., Piedra M. E., Ros M. A. and Hurle J. M. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 1997, **124** (6): 1109-1117.
- Mackie E. J. and Murphy L. I. The role of tenascin-C and related glycoproteins in early chondrogenesis. *Microscopy Research and Technique* 1998, **43** (2): 102-110.
- Mackie E. J., Thesleff I. and Chiquetehrisman R. Tenascin Is Associated with Chondrogenic and Osteogenic Differentiation In vivo and Promotes Chondrogenesis In vitro. *Journal of Cell Biology* 1987, **105** (6): 2569-2579.
- MacLean H. E., Guo J., Knight M. C., Zhang P., Cobrinik D. and Kronenberg H. M. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *J Clin Invest* 2004, **113** (9): 1334-1343.
- Majumdar M. K., Askew R., Schelling S., Stedman N., Blanchet T., Hopkins B., Morris E. A. and Glasson S. S. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007, **56** (11): 3670-3674.
- Majumdar M. K., Wang E. and Morris E. A. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 2001, **189** (3): 275-284.
- Mallein-Gerin F., Kosher R. A., Upholt W. B. and Tanzer M. L. Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by in situ hybridization. *Dev Biol* 1988, **126** (2): 337-345.
- Mansour S., Hall C. M., Pembrey M. E. and Young I. D. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet* 1995, **32** (6): 415-420.
- Maroudas A., Bayliss M. T., Uchitel-Kaushansky N., Schneiderman R. and Gilav E. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys* 1998, **350** (1): 61-71.
- Melnick M., Jaskoll T., Brownell A. G., MacDougall M., Bessem C. and Slavkin H. C. Spatiotemporal patterns of fibronectin distribution during embryonic development. I. Chick limbs. *J Embryol Exp Morphol* 1981, **63**: 193-206.
- Mertens P. R., Harendza S., Pollock A. S. and Lovett D. H. Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J Biol Chem* 1997, **272** (36): 22905-22912.
- Miller J. R. The Wnts. *Genome Biol* 2002, **3** (1): REVIEWS3001.
- Minina E., Kreschel C., Naski M. C., Ornitz D. M. and Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 2002, **3** (3): 439-449.
- Moser M., Bosserhoff A. K., Hunziker E. B., Sandell L., Fassler R. and Buettner R. Ultrastructural cartilage abnormalities in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2002, **22** (5): 1438-1445.

- Moser M., Imhof A., Pscherer A., Bauer R., Amselgruber W., Sinowatz F., Hofstadter F., Schule R. and Buettner R. Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development* 1995, **121** (9): 2779-2788.
- Moser M., Ruschoff J. and Buettner R. Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 1997, **208** (1): 115-124.
- Mueller M. B. and Tuan R. S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2008, **58** (5): 1377-1388.
- Muller-Ladner U., Bosserhoff A. K., Dreher K., Hein R., Neidhart M., Gay S., Scholmerich J., Buettner R. and Lang B. MIA (melanoma inhibitory activity): a potential serum marker for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999, **38** (2): 148-154.
- Musacchio A., Saraste M. and Wilmanns M. High-resolution crystal structures of tyrosine kinase SH3 domains complexed with proline-rich peptides. *Nat Struct Biol* 1994, **1** (8): 546-551.
- Nah H. D., Rodgers B. J., Kulyk W. M., Kream B. E., Kosher R. A. and Upholt W. B. In situ hybridization analysis of the expression of the type II collagen gene in the developing chicken limb bud. *Coll Relat Res* 1988, **8** (4): 277-294.
- Nakamura T., Aikawa T., Iwamoto-Enomoto M., Iwamoto M., Higuchi Y., Pacifici M., Kinto N., Yamaguchi A., Noji S., Kurisu K. and Matsuya T. Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **237** (2): 465-469.
- Neidhart M., Muller-Ladner U., Frey W., Bosserhoff A. K., Colombani P. C., Frey-Rindova P., Hummel K. M., Gay R. E., Hauselmann H. and Gay S. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, **8** (3): 222-229.
- Neuhold L. A., Killar L., Zhao W., Sung M. L., Warner L., Kulik J., Turner J., Wu W., Billingham C., Meijers T., Poole A. R., Babij P. and DeGennaro L. J. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001, **107** (1): 35-44.
- Ng L. J., Wheatley S., Muscat G. E., Conway-Campbell J., Bowles J., Wright E., Bell D. M., Tam P. P., Cheah K. S. and Koopman P. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 1997, **183** (1): 108-121.
- Niebler S. and Bosserhoff A. K. The transcription factor activating enhancer-binding protein epsilon (AP-2epsilon) regulates the core promoter of type II collagen (COL2A1). *FEBS J* 2013, **280** (6): 1397-1408.
- Nishida T., Kubota S., Kojima S., Kuboki T., Nakao K., Kushibiki T., Tabata Y. and Takigawa M. Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor). *J Bone Miner Res* 2004, **19** (8): 1308-1319.
- Norman J. T., Lindahl G. E., Shakib K., En-Nia A., Yilmaz E. and Mertens P. R. The Y-box binding protein YB-1 suppresses collagen alpha 1(I) gene transcription via an evolutionarily conserved regulatory element in the proximal promoter. *J Biol Chem* 2001, **276** (32): 29880-29890.
- Oberlender S. A. and Tuan R. S. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 1994a, **120** (1): 177-187.
- Oberlender S. A. and Tuan R. S. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun* 1994b, **2** (6): 521-537.
- Oda Y., Ohishi Y., Saito T., Hinoshita E., Uchiumi T., Kinukawa N., Iwamoto Y., Kohno K., Kuwano M. and Tsuneyoshi M. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 2003, **199** (2): 251-258.

- Oda Y., Sakamoto A., Shinohara N., Ohga T., Uchiumi T., Kohno K., Tsuneyoshi M., Kuwano M. and Iwamoto Y. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 1998, **4** (9): 2273-2277.
- Ohbayashi N., Shibayama M., Kurotaki Y., Imanishi M., Fujimori T., Itoh N. and Takada S. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 2002, **16** (7): 870-879.
- Onoue K., Kusubashi H., Sato Y., Wakitani S. and Takagi M. Quantitative correlation between production rate of melanoma inhibitory activity and aggrecan gene expression level during differentiation from mesenchymal stem cells to chondrocytes and redifferentiation of chondrocytes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2011, **111** (5): 594-596.
- Orford K., Crockett C., Jensen J. P., Weissman A. M. and Byers S. W. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 1997, **272** (40): 24735-24738.
- Ornitz D. M. and Marie P. J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 2002, **16** (12): 1446-1465.
- Otto F., Thornell A. P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K. C., Rosewell I. R., Stamp G. W., Beddington R. S., Mundlos S., Olsen B. R., Selby P. B. and Owen M. J. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997, **89** (5): 765-771.
- Perez R. P., Zhang P., Bosserhoff A. K., Buettner R. and Abu-Hadid M. Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Hum Pathol* 2000, **31** (11): 1381-1388.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. and Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, **284** (5411): 143-147.
- Plaas A., Osborn B., Yoshihara Y., Bai Y., Bloom T., Nelson F., Mikecz K. and Sandy J. D. Aggrecanolytic in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15** (7): 719-734.
- Poole A. R. The growth plate: Cellular physiology, cartilage assembly and mineralization. In: *Cartilage: Molecular aspects*. B. K. Hall and S. A. Newman (Ed.). Boca Raton, FL, USA. CRC Press 1991: 179-211.
- Poot M., Hoehn H., Kubbies M., Grossmann A., Chen Y. C. and Rabinovitch P. S. Cell-Cycle Analysis Using Continuous Bromodeoxyuridine Labeling and Hoechst-33358 Ethidium-Bromide Bivariate Flow-Cytometry. *Methods in Cell Biology, Vol 41* 1994, **41**: 327-340.
- Poser I., Tatzel J., Kuphal S. and Bosserhoff A. K. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* 2004, **23** (36): 6115-6124.
- Prasanth K. V., Prasanth S. G., Xuan Z., Hearn S., Freier S. M., Bennett C. F., Zhang M. Q. and Spector D. L. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 2005, **123** (2): 249-263.
- Pritzker K. P. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis* 1994, **53** (6): 406-420.
- Pritzker K. P., Gay S., Jimenez S. A., Ostergaard K., Pelletier J. P., Revell P. A., Salter D. and van den Berg W. B. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14** (1): 13-29.
- Provot S., Kempf H., Murtaugh L. C., Chung U. I., Kim D. W., Chyung J., Kronenberg H. M. and Lassar A. B. Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development* 2006, **133** (4): 651-662.

- Purple C. R., Choy B. K., Goldring M. B. and Sandell L. Transcriptional regulation of type II collagen by activating protein-2 (AP-2). *47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society* 2001. San Francisco, CA, USA.
- Recker R. R. Embryology, anatomy and microstructure of bone. In: *Disorders of bone and mineral metabolism*. F. L. Coe and M. J. Favus (Ed.). New York, NY, USA. Raven Press 1992: 219-240.
- Rees W. A., Yager T. D., Korte J. and Vonhippel P. H. Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting. *Biochemistry* 1993, **32** (1): 137-144.
- Reinhold M. I., Kapadia R. M., Liao Z. and Naski M. C. The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis. *J Biol Chem* 2006, **281** (3): 1381-1388.
- Rendtorff N. D., Frodin M., Attie-Bitach T., Vekemans M. and Tommerup N. Identification and characterization of an inner ear-expressed human melanoma inhibitory activity (MIA)-like gene (MIAL) with a frequent polymorphism that abolishes translation. *Genomics* 2001, **71** (1): 40-52.
- Roach H. I., Aigner T. and Kouri J. B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 2004, **9** (3): 265-277.
- Roach H. I. and Clarke N. M. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Miner Res* 1999, **14** (8): 1367-1378.
- Roach H. I., Yamada N., Cheung K. S., Tilley S., Clarke N. M., Oreffo R. O., Kokubun S. and Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005, **52** (10): 3110-3124.
- Roark E. F. and Greer K. Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev Dyn* 1994, **200** (2): 103-116.
- Robertson N. G., Heller S., Lin J. S., Resendes B. L., Weremowicz S., Denis C. S., Bell A. M., Hudspeth A. J. and Morton C. C. A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping. *Genomics* 2000, **66** (3): 242-248.
- Rock J. R., Lopez M. C., Baker H. V. and Harfe B. D. Identification of genes expressed in the mouse limb using a novel ZPA microarray approach. *Gene Expr Patterns* 2007, **8** (1): 19-26.
- Rudolph D., Tafuri A., Gass P., Hammerling G. J., Arnold B. and Schutz G. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95** (8): 4481-4486.
- Sahni M., Ambrosetti D. C., Mansukhani A., Gertner R., Levy D. and Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* 1999, **13** (11): 1361-1366.
- Sakano S., Zhu Y. and Sandell L. J. Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein and type II collagen expression during fracture healing are potential targets for Sox9 regulation. *J Bone Miner Res* 1999, **14** (11): 1891-1901.
- Salter D. M., Hughes D. E., Simpson R. and Gardner D. L. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1992, **31** (4): 231-234.
- San Antonio J. D. and Tuan R. S. Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Dev Biol* 1986, **115** (2): 313-324.
- Schiffner S., Zimara N., Schmid R. and Bosserhoff A. K. p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma. *Carcinogenesis* 2011, **32** (8): 1176-1182.

- Schittek B., Psenner K., Sauer B., Meier F., Iftner T. and Garbe C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int J Cancer* 2007, **120** (10): 2110-2118.
- Schmid R., Meyer K., Spang R., Schittek B. and Bosserhoff A. K. Melanoma inhibitory activity promotes melanoma development through activation of YBX1. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013.
- Schmid R., Schiffner S., Opolka A., Grassel S., Schubert T., Moser M. and Bosserhoff A. K. Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice. *Cell Death Dis* 2010, **1**: e97.
- Schmid T. M. and Linsenmayer T. F. Developmental acquisition of type X collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Dev Biol* 1985, **107** (2): 373-381.
- Schmidt J., Friebel K., Schonherr R., Coppolino M. G. and Bosserhoff A. K. Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels. *Cell Res* 2010, **20** (11): 1224-1238.
- Schorle H., Meier P., Buchert M., Jaenisch R. and Mitchell P. J. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 1996, **381** (6579): 235-238.
- Schubert T., Schlegel J., Schmid R., Opolka A., Grassel S., Humphries M. and Bosserhoff A. K. Modulation of cartilage differentiation by melanoma inhibiting activity/cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (MIA/CD-RAP). *Exp Mol Med* 2010, **42** (3): 166-174.
- Searls R. L., Hilfer S. R. and Mirow S. M. An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud. *Dev Biol* 1972, **28** (1): 123-137.
- Sekiya I., Tsuji K., Koopman P., Watanabe H., Yamada Y., Shinomiya K., Nifuji A. and Noda M. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 2000, **275** (15): 10738-10744.
- Serra R., Karaplis A. and Sohn P. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1999, **145** (4): 783-794.
- Shakibaei M. Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol Histopathol* 1995, **10** (2): 339-349.
- Shakibaei M. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res* 1998, **240** (1): 95-106.
- Shakibaei M. and Merker H. J. Beta1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res* 1999, **296** (3): 565-573.
- Shakibaei M., Zimmermann B. and Merker H. J. Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* 1995, **43** (10): 1061-1069.
- Shapiro I. M., Adams C. S., Freeman T. and Srinivas V. Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005, **75** (4): 330-339.
- Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 2005, **8** (1): 11-17.
- Shibao K., Takano H., Nakayama Y., Okazaki K., Nagata N., Izumi H., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. and Itoh H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1999, **83** (6): 732-737.

- Shiomi T., Lemaitre V., D'Armiento J. and Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int* 2010, **60** (7): 477-496.
- Sinnberg T., Sauer B., Holm P., Spangler B., Kuphal S., Bosserhoff A. and Schitteck B. MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop. *Exp Dermatol* 2012, **21** (4): 265-270.
- Skabkin M. A., Kiselyova O. I., Chernov K. G., Sorokin A. V., Dubrovin E. V., Yaminsky I. V., Vasiliev V. D. and Ovchinnikov L. P. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res* 2004, **32** (18): 5621-5635.
- Smith N., Dong Y., Lian J. B., Pratap J., Kingsley P. D., van Wijnen A. J., Stein J. L., Schwarz E. M., O'Keefe R. J., Stein G. S. and Drissi M. H. Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. *J Cell Physiol* 2005, **203** (1): 133-143.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and Klenk D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985, **150** (1): 76-85.
- Smits P., Dy P., Mitra S. and Lefebvre V. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol* 2004, **164** (5): 747-758.
- Smits P., Li P., Mandel J., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., de Crombrughe B. and Lefebvre V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 2001, **1** (2): 277-290.
- Solloway M. J., Dudley A. T., Bikoff E. K., Lyons K. M., Hogan B. L. and Robertson E. J. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 1998, **22** (4): 321-339.
- St-Jacques B., Hammerschmidt M. and McMahon A. P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999, **13** (16): 2072-2086.
- Stahlecker J., Gauger A., Bosserhoff A., Buttner R., Ring J. and Hein R. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res* 2000, **20** (6D): 5041-5044.
- Stickeler E., Fraser S. D., Honig A., Chen A. L., Berget S. M. and Cooper T. A. The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *EMBO J* 2001, **20** (14): 3821-3830.
- Stirpe N. S. and Goetinck P. F. Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb. *Development* 1989, **107** (1): 23-33.
- Stoick-Cooper C. L., Weidinger G., Riehle K. J., Hubbert C., Major M. B., Fausto N. and Moon R. T. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 2007, **134** (3): 479-489.
- Stoll R., Renner C., Zweckstetter M., Bruggert M., Ambrosius D., Palme S., Engh R. A., Golob M., Breibach I., Buettner R., Voelter W., Holak T. A. and Bosserhoff A. K. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J* 2001, **20** (3): 340-349.
- Stricker S., Fundele R., Vortkamp A. and Mundlos S. Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 2002, **245** (1): 95-108.
- Studer D., Millan C., Ozturk E., Maniura-Weber K. and Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 2012, **24**: 118-135; discussion 135.

- Sudbeck P., Schmitz M. L., Baeuerle P. A. and Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet* 1996, **13** (2): 230-232.
- Summerbell D. and Wolpert L. Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing. *Nat New Biol* 1972, **239** (88): 24-26.
- Sutherland B. W., Kucab J., Wu J., Lee C., Cheang M. C. U., Yorida E., Turbin D., Dedhar S., Nelson C., Pollak M., Grimes H. L., Miller K., Badve S., Huntsman D., Blake-Gilks C., Chen M., Pallen C. J. and Dunn S. E. Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 2005, **24** (26): 4281-4292.
- Suzuki S. T. Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J Cell Biochem* 1996, **61** (4): 531-542.
- Swiderski R. E. and Solursh M. Differential co-expression of long and short form type IX collagen transcripts during avian limb chondrogenesis in ovo. *Development* 1992a, **115** (1): 169-179.
- Swiderski R. E. and Solursh M. Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev Dyn* 1992b, **194** (2): 118-127.
- Takada Y., Kamata T., Irie A., Puzon-McLaughlin W. and Zhang X. P. Structural basis of integrin-mediated signal transduction. *Matrix Biol* 1997, **16** (4): 143-151.
- Takamatsu N., Kanda H., Tsuchiya I., Yamada S., Ito M., Kabeno S., Shiba T. and Yamashita S. A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein. *Mol Cell Biol* 1995, **15** (7): 3759-3766.
- Takeda S., Bonnamy J. P., Owen M. J., Ducy P. and Karsenty G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 2001, **15** (4): 467-481.
- Takigawa Y., Hata K., Muramatsu S., Amano K., Ono K., Wakabayashi M., Matsuda A., Takada K., Nishimura R. and Yoneda T. The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *J Cell Sci* 2010, **123** (Pt 21): 3780-3788.
- Tamamura Y., Otani T., Kanatani N., Koyama E., Kitagaki J., Komori T., Yamada Y., Costantini F., Wakisaka S., Pacifici M., Iwamoto M. and Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 2005, **280** (19): 19185-19195.
- Tan L., Peng H., Osaki M., Choy B. K., Auron P. E., Sandell L. J. and Goldring M. B. Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2003, **278** (20): 17688-17700.
- Tashiro E., Tsuchiya A. and Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 2007, **98** (5): 629-635.
- Tatzel J., Poser I., Schroeder J. and Bosserhoff A. K. Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res* 2005, **18** (2): 92-101.
- Tavella S., Raffo P., Tacchetti C., Cancedda R. and Castagnola P. N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res* 1994, **215** (2): 354-362.
- Thorogood P. V. and Hinchliffe J. R. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol* 1975, **33** (3): 581-606.

- Toole B. P., Jackson G. and Gross J. Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972, **69** (6): 1384-1386.
- Toole B. P. and Linsenmayer T. F. Newer knowledge of skeletogenesis: macromolecular transitions in the extracellular matrix. *Clin Orthop Relat Res* 1977, (129): 258-278.
- Topol L., Chen W., Song H., Day T. F. and Yang Y. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem* 2009, **284** (5): 3323-3333.
- Topol L., Jiang X., Choi H., Garrett-Beal L., Carolan P. J. and Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 2003, **162** (5): 899-908.
- Torres M. A., Yang-Snyder J. A., Purcell S. M., DeMarais A. A., McGrew L. L. and Moon R. T. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 1996, **133** (5): 1123-1137.
- Tscheudschilsuren G., Bosserhoff A. K., Schlegel J., Vollmer D., Anton A., Alt V., Schnettler R., Brandt J. and Proetzel G. Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA. *Exp Cell Res* 2006, **312** (1): 63-72.
- Tsonis P. A. and Walker E. Cell populations synthesizing cartilage proteoglycan core protein in the early chick limb bud. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **174** (2): 688-695.
- Tsuji K., Bandyopadhyay A., Harfe B. D., Cox K., Kakar S., Gerstenfeld L., Einhorn T., Tabin C. J. and Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006, **38** (12): 1424-1429.
- Umlauf D., Frank S., Pap T. and Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* 2010, **67** (24): 4197-4211.
- van de Wetering M. and Clevers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J* 1992, **11** (8): 3039-3044.
- van Groningen J. J., Bloemers H. P. and Swart G. W. Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display. *Cancer Res* 1995, **55** (24): 6237-6243.
- van Wijnen A. J., Stein G. S., Gergen J. P., Groner Y., Hiebert S. W., Ito Y., Liu P., Neil J. C., Ohki M. and Speck N. Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene* 2004, **23** (24): 4209-4210.
- Verzijl N., DeGroot J., Thorpe S. R., Bank R. A., Shaw J. N., Lyons T. J., Bijlsma J. W., Lafeber F. P., Baynes J. W. and TeKoppele J. M. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000, **275** (50): 39027-39031.
- Vincenti M. P. and Brinckerhoff C. E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* 2002, **4** (3): 157-164.
- Vortkamp A., Lee K., Lanske B., Segre G. V., Kronenberg H. M. and Tabin C. J. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996, **273** (5275): 613-622.
- Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F. D., Keutel J., Hustert E., Wolf U., Tommerup N., Schempp W. and Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994, **79** (6): 1111-1120.
- Wallis G. A. Bone growth: coordinating chondrocyte differentiation. *Curr Biol* 1996, **6** (12): 1577-1580.

- Wang E. A., Israel D. I., Kelly S. and Luxenberg D. P. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 1993, **9** (1): 57-71.
- Wang F. and Zhu Y. Aquaporin-1: a potential membrane channel for facilitating the adaptability of rabbit nucleus pulposus cells to an extracellular matrix environment. *J Orthop Sci* 2011, **16** (3): 304-312.
- Wang H. V., Vaupel K., Buettner R., Bosserhoff A. K. and Moser M. Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev Dyn* 2004, **231** (1): 128-135.
- Wang M., Sampson E. R., Jin H., Li J., Ke Q. H., Im H. J. and Chen D. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2013, **15** (1): R5.
- Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 1999, **27** (6): 1409-1420.
- Weir E. C., Philbrick W. M., Amling M., Neff L. A., Baron R. and Broadus A. E. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93** (19): 10240-10245.
- Wenke A. K., Grassel S., Moser M. and Bosserhoff A. K. The cartilage-specific transcription factor Sox9 regulates AP-2epsilon expression in chondrocytes. *FEBS J* 2009, **276** (9): 2494-2504.
- Wenke A. K., Niebler S., Grassel S. and Bosserhoff A. K. The transcription factor AP-2varepsilon regulates CXCL1 during cartilage development and in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011, **19** (2): 206-212.
- Wenke A. K., Rothhammer T., Moser M. and Bosserhoff A. K. Regulation of integrin alpha10 expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2epsilon and Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345** (1): 495-501.
- White A. P., Vaccaro A. R., Hall J. A., Whang P. G., Friel B. C. and McKee M. D. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop* 2007, **31** (6): 735-741.
- Widelitz R. B., Jiang T. X., Murray B. A. and Chuong C. M. Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J Cell Physiol* 1993, **156** (2): 399-411.
- Williams T., Admon A., Luscher B. and Tjian R. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* 1988, **2** (12A): 1557-1569.
- Wrana J. L., Attisano L., Carcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X. F. and Massague J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992, **71** (6): 1003-1014.
- Wright E., Hargrave M. R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A. and Koopman P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 1995, **9** (1): 15-20.
- Wu J., Lee C., Yokom D., Jiang H., Cheang M. C., Yorida E., Turbin D., Berquin I. M., Mertens P. R., Iftner T., Gilks C. B. and Dunn S. E. Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res* 2006, **66** (9): 4872-4879.
- Wu J., Stratford A. L., Astanehe A. and Dunn S. E. YB-1 is a Transcription/Translation Factor that Orchestrates the Oncogenome by Hardwiring Signal Transduction to Gene Expression. *Translational Oncogenomics* 2007, (2): 49-65.

- Wuelling M. and Vortkamp A. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* 2010, **25** (4): 625-631.
- Xie W. F., Kondo S. and Sandell L. J. Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2. *J Biol Chem* 1998, **273** (9): 5026-5032.
- Xie W. F., Zhang X., Sakano S., Lefebvre V. and Sandell L. J. Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J Bone Miner Res* 1999, **14** (5): 757-763.
- Xie W. F., Zhang X. and Sandell L. J. The 2.2-kb promoter of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein controls gene expression in cartilage and embryonic mammary buds of transgenic mice. *Matrix Biol* 2000, **19** (6): 501-509.
- Yamaguchi T. P. and Rossant J. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Current Opinion in Genetics & Development* 1995, **5** (4): 485-491.
- Yamashita S., Andoh M., Ueno-Kudoh H., Sato T., Miyaki S. and Asahara H. Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Exp Cell Res* 2009, **315** (13): 2231-2240.
- Yoon B. S., Ovchinnikov D. A., Yoshii I., Mishina Y., Behringer R. R. and Lyons K. M. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102** (14): 5062-5067.
- Yoon B. S., Pogue R., Ovchinnikov D. A., Yoshii I., Mishina Y., Behringer R. R. and Lyons K. M. BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development* 2006, **133** (23): 4667-4678.
- Yoshida C. A., Yamamoto H., Fujita T., Furuichi T., Ito K., Inoue K., Yamana K., Zanma A., Takada K., Ito Y. and Komori T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 2004, **18** (8): 952-963.
- Yu H., Chen J. K., Feng S., Dalgarno D. C., Brauer A. W. and Schreiber S. L. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 1994, **76** (5): 933-945.
- Yu Y. Y., Lieu S., Lu C. and Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* 2010, **47** (1): 65-73.
- Zelzer E., Glotzer D. J., Hartmann C., Thomas D., Fukai N., Soker S. and Olsen B. R. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 2001, **106** (1-2): 97-106.
- Zelzer E., Mamluk R., Ferrara N., Johnson R. S., Schipani E. and Olsen B. R. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004, **131** (9): 2161-2171.
- Zhang J., Hagopian-Donaldson S., Serbedzija G., Elsemore J., Plehn-Dujowich D., McMahon A. P., Flavell R. A. and Williams T. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 1996, **381** (6579): 238-241.
- Zhang M., Ho H. C., Sheu T. J., Breyer M. D., Flick L. M., Jonason J. H., Awad H. A., Schwarz E. M. and O'Keefe R. J. EP1(-/-) mice have enhanced osteoblast differentiation and accelerated fracture repair. *J Bone Miner Res* 2011, **26** (4): 792-802.
- Zhang P., Jimenez S. A. and Stokes D. G. Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9. *J Biol Chem* 2003, **278** (1): 117-123.
- Zhang P., Liegeois N. J., Wong C., Finegold M., Hou H., Thompson J. C., Silverman A., Harper J. W., DePinho R. A. and Elledge S. J. Altered cell differentiation and proliferation in

- mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 1997, **387** (6629): 151-158.
- Zhang Z. and Carmichael G. G. The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 2001, **106** (4): 465-475.
- Zhao L., Li G. and Zhou G. Q. SOX9 directly binds CREB as a novel synergism with the PKA pathway in BMP-2-induced osteochondrogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 2009, **24** (5): 826-836.
- Zhao Q., Eberspaecher H., Lefebvre V. and De Crombrughe B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 1997, **209** (4): 377-386.
- Zheng Q., Zhou G., Morello R., Chen Y., Garcia-Rojas X. and Lee B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 2003, **162** (5): 833-842.
- Zhou G., Garofalo S., Mukhopadhyay K., Lefebvre V., Smith C. N., Eberspaecher H. and de Crombrughe B. A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J Cell Sci* 1995, **108 (Pt 12)**: 3677-3684.
- Zhou G., Zheng Q., Engin F., Munivez E., Chen Y., Sebald E., Krakow D. and Lee B. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103** (50): 19004-19009.
- Zimmermann B. Assembly and disassembly of gap junctions during mesenchymal cell condensation and early chondrogenesis in limb buds of mouse embryos. *J Anat* 1984, **138 (Pt 2)**: 351-363.
- Zimmermann B., Scharlach E. and Kaatz R. Cell contact and surface coat alterations of limb-bud mesenchymal cells during differentiation. *J Embryol Exp Morphol* 1982, **72**: 1-18.

Abkürzungsverzeichnis

A

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

cDNA	engl.: complementary DNA
------	--------------------------

D

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N',Tetraacetat
et al.	lat.: et alii (und andere)

F

FKS	Fötales Kälberserum
-----	---------------------

G

g	Gramm, Erdbeschleunigung
---	--------------------------

H

h	Stunde(n)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung

K

k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton

L

l	Liter
LB	engl.: lysogeny broth

M

m	Milli (10^{-3}), Meter
M	Molarität (mol/L)
mA	Milliampere
min	Minute(n)
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
mRNA	engl.: messenger RNA
μ	Mikro (10^{-6})

N

n	Nano (10^{-9})
ns	nicht signifikant
n.v.	nicht verfügbar/ nicht vorhanden

P

p	Pico (10^{-12})
p. a.	lat.: pro analysi (für die Analyse)
PAA	Polyacrylamid
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R

RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
RNA	eng.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	engl.: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

S

SDS	engl.: Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
s	Sekunde(n)

T

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan/Wasserstoffchlorid

U

U	Unit, Uracil
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
(v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
(v/w)	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
°C	Grad Celsius